

HPLC-Analysen zur Bedeutung genetischer Varianten organischer Kationentransporter für hydrophile kationische Medikamente

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sina Tadjerpisheh

aus Teheran

Marburg/Lahn: 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Brockmüller

Tag der Disputation am 04.04.2016

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis
II.	Tabellenverzeichnis
III.	Gleichungsverzeichnis
IV.	Eidesstattliche Versicherung
V.	Danksagungen
VI.	Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung genetischer Variationen in der Pharmakotherapie	1
1.2	Pharmakokinetik von Arzneistoffen	3
1.2.1	Diffusion durch biologische Membranen	5
1.2.2	Protein-vermittelter Transport	7
1.2.3	Organische Basen und organische Säuren	8
1.2.4	Membrantransport protonierter und nichtprotonierter Arzneistoffe	10
1.3	Organische Kationentransporter	12
1.3.1	Struktur und Funktion der organischen Kationentransporter (OCTs)	14
1.4	Genetische Varianten des OCT1	20
1.5	Proguanil und Cycloguanil	21
1.5.1	Medizinischer Hintergrund	21
1.5.2	Pathogenese der Malaria	21
1.5.3	Chemische Struktur von Proguanil und Cycloguanil	25
1.5.4	Metabolismus	25
1.5.5	Indikation, Kontraindikation, Neben- und Wechselwirkungen	26
1.6	Amisulprid, Tiaprid, Sultopirid und Sulprid	26
1.6.1	Medizinischer Hintergrund	26
1.6.2	Metabolismus	29
1.6.3	Indikation, Kontraindikation, Neben- und Wechselwirkungen	29
1.7	Debrisoquin und 4-Hydroxydebrisoquin	30
1.7.1	Medizinischer Hintergrund	30
1.7.2	Chemische Struktur	31
1.7.3	Metabolismus	32
1.8	Ziele und Zusammenfassung	33
1.9	Aims and summary of this work	35

Inhaltsverzeichnis

2	Material und Methoden	37
2.1	Reagenzien.....	37
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	39
2.3	Geräte	40
2.4	Software und Datenbank	41
2.5	Zelllinien	41
2.6	Methoden	43
2.6.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	43
2.6.2	Konzentrationsbestimmungen mittels HPLC	44
2.6.3	Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Arzneistoffen.....	53
2.6.4	Methodenvalidierung in der HPLC	54
2.7	In-vitro-Analysen der zellulären Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil.....	59
2.7.1	PAMPA-Assay	59
2.7.2	HEK-Zellen	61
2.7.3	Versuch der direkten Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil an mit OCT transfizierten HEK293-Zellen	65
2.7.4	Versuch der konzentrationsabhängigen Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil	67
2.7.5	Messungen zur Inhibition der Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch andere Pharmaka.....	67
2.7.6	Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch Proteinvarianten von OCT1	68
2.8	Erythrozyten	69
2.8.1	Arbeiten mit Erythrozyten.....	69
2.8.2	In-vitro-Analyse der erythrozytären Aufnahme von Proguanil.....	70
2.9	Probenvorbereitung von Proguanil, Cycloguanil und Pyrimethamin	72
2.9.1	Verdünnungsreihen	72
2.9.2	HPLC-Bedingungen und angewandte Materialien.....	75
2.10	Probenvorbereitung von Amisulprid, Sultoprid, Tiaprid, und Metoclopramid.....	76
2.10.1	Verdünnungsreihen	76
2.10.2	HPLC- Bedingungen und angewandte Materialien.....	78
2.11	Probenvorbereitung Debrisoquin, 4-Hydroxydebrisoquin und Venlafaxin.....	79
2.11.1	Verdünnungsreihen	79

Inhaltsverzeichnis

2.11.2	HPLC- Bedingungen und angewandte Materialien.....	81
3	Ergebnisse.....	82
3.1	Bedeutung von OCT1 für die zelluläre Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil.....	82
3.1.1	Methodenvalidierung.....	82
3.1.2	Kalibratoren für Proguanil und Cycloguanil	82
3.1.3	Qualitätskontrollen	83
3.1.4	Präzision	83
3.1.5	Richtigkeit	86
3.1.6	Linearität	87
3.1.7	Darstellung der Chromatogramme	89
3.1.8	Probenvorbereitung	91
3.2	Charakterisierung des Transports von Proguanil an OCT-transfizierten HEK293-Zellen	91
3.2.1	Untersuchung der Permeabilität mit PAMPA-Assay	91
3.2.2	Direkte Aufnahme von Proguanil an den OCTs der SLC22-Familie..	92
3.2.3	Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCTs.....	97
3.2.4	Effekte der genetischen Polymorphismen von OCT1 auf die Aufnahme von Proguanil	107
3.2.5	Interaktion der Aufnahme von Proguanil an OCT1 durch Zugabe weiterer Arzneistoffe.....	109
3.3	Charakterisierung des Transports von Cycloguanil an OCT-transfizierten HEK293-Zellen	111
3.3.1	PAMPA-Messung von Cycloguanil.....	111
3.3.2	Direkte Aufnahme von Cycloguanil an den OCTs der SLC22 - Familie.....	113
3.3.3	Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil an OCT1	116
3.3.4	Effekt des genetischen Polymorphismus von OCT1 auf die Aufnahme von Cycloguanil	119
3.3.5	Interaktion der Aufnahme von Cycloguanil an OCT1 durch weitere Arzneistoffe	121
3.4	Charakterisierung des Transports von Proguanil in Erythrozyten.	125
3.4.1	Direkte Aufnahme von Proguanil in die Erythrozyten.....	125
3.4.2	Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in die Erythrozyten	127
3.4.3	OCT- Inhibition von Proguanil an Erythrozyten.....	129

Inhaltsverzeichnis

3.5	Ergebnisse der Methodvalidierung von Amisulprid	131
3.5.1	Kalibratoren.....	131
3.5.2	Qualitätskontrollen	131
3.5.3	Präzision	132
3.5.4	Richtigkeit	135
3.5.5	Linearität	136
3.5.6	Darstellung der Chromatogramme	137
3.5.7	Probenvorbereitung	140
3.6	Konzentrationsbestimmung von Debrisoquin.....	140
3.6.1	Methodvalidierung.....	140
4	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	143
4.1	Auswahl der Methode für Proguanil und Cycloguanil	143
4.1.1	Methodenoptimierung und Methodvalidierung	143
4.2	Membranpermeabilität der Antimalariamittel Proguanil und Cycloguanil am PAMPA-Assay	145
4.3	Antimalariamittel Proguanil und dessen aktiver Metabolit Cycloguanil als Substrate für OCT	146
4.4	Bedeutung von OCT1-Proteinvarianten für die Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil <i>in-vitro</i>	147
4.5	Inhibition der Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch weitere Pharmaka an HEK 293-Zellen.....	149
4.6	Bedeutung des erythrozytären Transports von Proguanil.....	150
4.7	Bestimmung von Amisulprid, Sultoprid und Tiaprid mittels HPLC	151
4.8	Schlussfolgerungen	153
5	Lebenslauf	156
6.	Literaturverzeichnis	158
7.	Anhang	172
8.	Publikationen.....	175

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Prozesse in einer Zelle	4
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Transportzyklus.....	11
Abbildung 1-3: modifizierter Transport Organischer Kationen (OC) in Hepatozyten	13
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der SLC22-Familie.....	14
Abbildung 1-5: Membrantopologie des organischen Kationentransporters 1 (OCT1),	17
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Pathogenese der Malariaerkrankung	24
Abbildung 1-7: Darstellung der protonierten und unprotonierten Form von Debrisoquin	31
Abbildung 1-8: Metabolisierung von Debrisoquin zu 4-Hydroxydebrisoquin und anschließender Glukuronidierung.....	32
Abbildung 2-1: Stationäre Phase als polare Komponente.....	46
Abbildung 2-2: Stationäre Phase als unpolare Komponente.....	47
Abbildung 2-3: Einstellung des Gleichgewichts zwischen der mobilen und stationären Phase	48
Abbildung 2-4: Instrumenteller Aufbau einer HPLC-Anlage	49
Abbildung 2-5: Van- Deemter-Kurve	52
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Inhibitoren zu den einzelnen organischen Kationentransportern.....	72
Abbildung 3-1: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Proguanil.....	87
Abbildung 3-2: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Cycloguanil.....	88
Abbildung 3-3: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Proguanil.....	88
Abbildung 3-4: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Cycloguanil.....	89
Abbildung 3-5: Chromatographische Darstellung von Proguanil und Pyrimethamin	90
Abbildung 3-6: Chromatographische Darstellung von Cycloguanil und Pyrimethamin	90
Abbildung 3-7: Bestimmung der Carrier-unabhängigen Membranpermeabilität von Proguanil mittels PAMPA.....	92
Abbildung 3-8: OCT1-abhängige Aufnahme von Proguanil	93
Abbildung 3-9: OCT2-abhängige Aufnahme von Proguanil.....	94
Abbildung 3-10: OCT3-abhängige Aufnahme von Proguanil.....	95
Abbildung 3-11A und B: OCTN1- und OCTN2-abhängige Aufnahme von Proguanil.....	96
Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT1.....	98
Abbildung 3-13: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT1.....	98
Abbildung 3-14: Kurvenschar dreier unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT1.....	99
Abbildung 3-15: Kurvenschar drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen an OCT1.....	100
Abbildung 3-16: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil mit aufsteigender Konzentration an OCT2 und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.....	101
Abbildung 3-17: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT2.....	101

Abbildung 3-18: Kurvenschar drei unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT2 -transfizierten HEK293- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.	102
Abbildung 3-19: Kurvenschar der drei durchgeführten Versuche zur konzentrationsabhängigen Aufnahme von Proguanil an OCT2.	102
Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT3- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.	103
Abbildung 3-21: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT3-transfizierten HEK293- Zellen.	104
Abbildung 3-22: Kurvenschar drei unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT3-transfizierten HEK293-Zellen.	105
Abbildung 3-23: Kurvenschar drei von Abbildung 3.22 durchgeführten Versuchen.	105
Abbildung 3-24: Effekt der genetischen Polymorphismen am OCT1-Transporterprotein	107
Abbildung 3-25A und B: Interaktion von Proguanil mit Arzneistoffen an OCT1	110
Abbildung 3-26: Bestimmung der Carrier-unabhängigen Membranpermeabilität von Cycloguanil mittels PAMPA.	112
Abbildung 3-27: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an OCT1 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen.	113
Abbildung 3-28: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCT2 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen,	114
Abbildung 3-29: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCT3 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen,	114
Abbildung 3-30: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCTN1 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen.	115
Abbildung 3-31: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCTN2 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen	115
Abbildung 3-32: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil an OCT1 und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.	116
Abbildung 3-33: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil in aufsteigender Konzentration an OCT1-transfizierten HEK293- Zellen,	117
Abbildung 3-34: Kurvenschar vier unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Cycloguanil an OCT1- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.	118
Abbildung 3-35: Kurvenschar von vier unabhängig durchgeführten Versuchen.	118
Abbildung 3-36: Effekt der genetischen Polymorphismen am OCT1-Transporterprotein auf die Aufnahme von Cycloguanil.	119
Abbildung 3-37A und B: Interaktion von Cycloguanil mit Arzneistoffe an OCT1,	122
Abbildung 3-38: Direkte sowie inhibierte erythrozytäre Aufnahme von Proguanil	125
Abbildung 3-39: Direkte und inhibierte erythrozytäre Aufnahme von Proguanil	126
Abbildung 3-40: Konzentrationsabhängige erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei aufsteigender Konzentration bei unterschiedlichen Temperaturen.	127

Abbildung 3-41: Konzentrationsabhängige erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei aufsteigender Konzentration.....	128
Abbildung 3-42: Kurvenschar der erythrozytären Aufnahme von Proguanil.	129
Abbildung 3-43: Inhibition der Aufnahme von Proguanil	130
Abbildung 3-44: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Amisulprid.	136
Abbildung 3-45: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Amisulprid.	137
Abbildung 3-46: 1. Chromatographische Darstellung von Amisulprid und Metoclopramid	138
Abbildung 3-47: 2. Chromatographische Darstellung von Amisulprid und Metoclopramid.....	138
Abbildung 3-48: Chromatographische Darstellung von Sultoprid und Metoclopramid.	139
Abbildung 3-49: Chromatographische Darstellung von Tiaprid und Metoclopramid.....	139
Abbildung 3-50: Chromatographische Darstellung von Debrisoquin und Venlafaxin.	141
Abbildung 3-51: Chromatographische Darstellung von Debrisoquin und Venlafaxin.	142
Abbildung 4-1: Chemische Strukturen und reagierende Gruppen an Proguanil und Cycloguanil	145
Abbildung 7-1: Test nach David.	172
Abbildung 7-2: Schnelltest nach Grubbs	173
Abbildung 7-3: Tabelle- t-Test.....	174

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Verteilung des OCT Transporter im menschlichen Körper	18
Tabelle 1-2: Pharmako-chemische Daten von Proguanil und Cycloguanil.....	25
Tabelle 1-3: Chemische Struktur der hier untersuchten Neuroleptika mit Benzamidstruktur	28
Tabelle 1-4: Chemische Struktur von Debrisoquin und 4-Hydroxydebrisoquin.....	31
Tabelle 2-1: Weitere Verwendete Arzneistoffe.....	42
Tabelle 2-2: Eigenschaften der Probenmoleküle.....	50
Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Kupfersulfat- Lösung	64
Tabelle 2-4: Zusammensetzung der BSA- Lösung	64
Tabelle 2-5: Angewandte Arzneistoffe zur Messung einer möglichen Inhibition des Influx- Transportes von Proguanil und Cycloguanil	68
Tabelle 2-6: Arzneistoffe zur Hemmung des Transports von Proguanil durch die Erythrozytenmembran.....	71
Tabelle 3-1: Auswertung der statistischen Daten der Kalibratoren für Proguanil	83
Tabelle 3-2: Auswertung der statistischen Daten der Kalibratoren von Cycloguanil	84
Tabelle 3-3: Auswertung der einzelnen Kalibratoren für Proguanil nach David.....	84
Tabelle 3-4: Auswertung der einzelnen Kalibratoren für Cycloguanil nach David.....	84
Tabelle 3-5: Berechnung der statistischen Daten der Qualitätskontrollen für Proguanil.....	85
Tabelle 3-6: Berechnung der statistischen Daten der Qualitätskontrollen für Cycloguanil.....	85
Tabelle 3-7: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen für Proguanil nach David.....	85
Tabelle 3-8: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen für Cycloguanil nach David.....	86
Tabelle 3-9: Sollwert-t-Test der Kalibratoren für Proguanil.....	86
Tabelle 3-10: Sollwert-t-Test der Kalibratoren für Cycloguanil.....	86
Tabelle 3-11: Kinetik der Aufnahme von Proguanil einzelner organischer Kationentransporter...	106
Tabelle 3-12: Effekt der SNPs von OCT1 auf die Aufnahme von Proguanil	108
Tabelle 3-13: Effekt der einzelnen Arzneistoffe auf die Aufnahme von Proguanil an OCT1.	110
Tabelle 3-14: Effekte der SNPs von OCT1 auf die Aufnahme von Cycloguanil	120
Tabelle 3-15: Effekt der einzelnen Arzneistoffe auf die Aufnahme von Cycloguanil an OCT1. ..	123
Tabelle 3-16: Auswertung der statistischen Werte der Kalibratoren	132
Tabelle 3-17: Auswertung der einzelnen Kalibratoren nach David	133
Tabelle 3-18: Auswertung der Kalibratoren nach Grubbs	133
Tabelle 3-19: Berechnung der statistischen Werte der Qualitätskontrollen.....	134
Tabelle 3-20: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen nach David.....	134
Tabelle 3-21: Berechnung der Qualitätskontrollen nach Grubbs.....	135
Tabelle 3-22: Sollwert-t-Test der Kalibratoren	135
Tabelle 3-23: Sollwert-t-Test der Qualitätskontrollen	136

III. Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1-1: 1. Fick'sches Gesetz.....	5
Gleichung 1-2: Berechnung des log P-Wertes	6
Gleichung 1-3: Berechnung des log D-Wertes.....	7
Gleichung 1-4: Gleichung der Dissoziationskonstanten	9
Gleichung 1-5: Gleichung eines Puffersystems	9
Gleichung 1-6: Gleichung zur Berechnung des pH-Wertes.....	9
Gleichung 2-1: Berechnung der Nettoretentionszeit	45
Gleichung 2-2: Berechnung des Retentionsfaktors	45
Gleichung 2-3: Berechnung der Trennstufenhöhe H	48
Gleichung 2-4: Berechnung des Variationskoeffizienten	55
Gleichung 2-5: Berechnung des Mittelwertes	55
Gleichung 2-6: Berechnung der Standardabweichung.....	55
Gleichung 2-7: Berechnung der Prüfgröße nach David	56
Gleichung 2-8: Berechnung der linearen Regression.....	58
Gleichung 2-9: Berechnung der Membranpermeabilität mittels des PAMPA-Assays	61

IV. Erklärung der Eidesstattlichen Versicherung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

HPLC-Analysen zur Bedeutung genetischer Varianten organischer Kationentransporter für hydrophile kationische Medikamente

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22.02.2016

.....
Sina Tadjerpisheh

V. Danksagungen

Mein Dank geht an meine Eltern und meine Schwestern, an meine liebe Linda und der Familie Eppler, die mich unterstützt haben und für mich da waren. Einen Dank geht an das Institut für Klinische Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller, der es mir ermöglicht hat, in meiner Heimatstadt die Promotion aufzunehmen und mich in der Promotionszeit unterstützt und gefördert hat. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Tzvetkov für die Begleitung der experimentellen Zellversuche und als Ansprechpartner in genetischen Fragen. Ein großes Dankeschön geht ebenfalls an Prof. Dr. rer. nat. Michael Keusgen, der mich als Promotionsstudent in Marburg aufgenommen und mir Hilfestellungen bei der Ausfertigung und Darstellung der Dissertation gegeben hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Hagos bedanken, der mir in Fragestellungen der Physiologie des Menschen zur Hilfe stand. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner lieben Kollegin Tina Seitz und den weiteren Mitarbeitern für die Unterstützung bedanken, mit denen sowohl die Arbeit eine Freude war als auch die Möglichkeit neben derselben auch gemeinsam lachen zu können. Viele Menschen habe ich während der Promotion kennengelernt, durch die zahlreichen Gespräche und gemeinsam verbrachte Stunden sind mir einige von ihnen sehr ans Herz gewachsen, auch ihnen möchte ich für die geistreiche Zeit danken.

Für Louis...

VI. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen (engl.: weight/volume)
°C	Grad Celsius
μ-	Mikro (1×10^{-6})
A	Ampere
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bsp.-weise	beispielsweise
BCRP	engl.: Breast cancer resistance proteine
BSA	Rinderserumalbumin (Engl.: bovine serum albumine)
BSEP	engl.: biliar export pump
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CYP450	Cytochrom-P450-Enzyme
Da	Dalton
Del	Deletion
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
et al.	und andere (lat.: et alii)
FBS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal bovine serum)
HCl	Salzsäure
L	Liter
M	Milli (1×10^{-3})
M	Molarität

Abkürzung	Bedeutung
MATE	engl.: multidrug and extrusion transporter
MeOH	Methanol
MDR	engl.: multidrug resistance Transporter
Min	Minute
mind.	mindestens
MPP ⁺	1-Methyl-1-Phenylpyridinium
MRP	engl.: multidrug-resistance related Protein
MW	arithmetischer Mittelwert
(n)	Anzahl
n-	Nano (1×10^{-9})
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCH ₃ COO	Natriumacetat
NTP	engl.: sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
OAT	Organischer Anionentransporter
OATP	engl.: organic anion transporting polypeptide
OCT1	Organischer Kationentransporter 1
OCT2	Organischer Kationentransporter 2
OCT3	Organischer Kationentransporter 3
OCTN1	Organischer Kationentransporter N1
OCTN2	Organischer Kationentransporter N2
p-	Pico (1×10^{-12})
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	engl.:sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SNP	engl.: single nucleotide polymorphism (Einzelnukelotidaustausch)

Abkürzung	Bedeutung
TEA ⁺	Tetraethylammonium
TBA	Tetrabutylammonium
WHO	Weltgesundheitsbehörde (engl.: World Health Organisation)
z.B.	zum Beispiel

*Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden, wo sie aufhört.*

Justus von Liebig (1803-73), deutscher Chemiker

1 Einleitung

1.1 Bedeutung genetischer Variationen in der Pharmakotherapie

Die Arzneimittelforschung hat sich insgesamt durch die Pharmakogenetik deutlich verändert. Der Begriff der Pharmakogenetik wurde Ende der 50iger Jahre des letzten Jahrhunderts durch den Humangenetiker Friedrich Vogel und Arno Motulsky bekannt. Zuvor wurde in den 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts durch Sir Archibald Garrod die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass aufgrund angeborener Variation Krankheiten entstehen können und nach der Einnahme von Fremdstoffen unerwartete Wirkungen auftreten können (Jaehde, 2010). Die Pharmakogenetik befasst sich unter anderem mit der Frage, welche Auswirkungen erbliche Varianten eines Gens auf die Biotransformation von Arzneistoffen im menschlichen Organismus herbeiführen können. Es hat sich herausgestellt, dass neben den Faktoren wie Alter, Geschlecht oder Organfunktionen sowie Interaktionen mit weiteren Arzneimitteln auch die genetische Variabilität einen wesentlichen Einfluss auf die Biotransformation von Arzneistoffen im menschlichen Organismus hat. Genetische Polymorphismen können demnach zu einer Veränderung sowohl der Pharmakokinetik als auch der Pharmakodynamik führen. Der resultierende pharmakologische Effekt kann sich in der Wirkung und Toxizität des Arzneistoffs zeigen.

Erbliche Variationen im menschlichen Genom treten in verschiedenen Formen auf. Der Austausch eines einzelnen Nukleotids (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) ist die am häufigsten vorkommende Variante im Genom des Menschen. Die Anzahl an SNPs im menschlichen Genom wird auf ca. 12 Millionen (HapMapConsortium, 2005) geschätzt. Als Polymorphismen werden diejenigen Sequenzvarianten bezeichnet, die sich in einer Population mit einer Häufigkeit von mehr als 1% zeigen. Ist dies nicht der Fall, spricht man von einer Mutation oder einer seltenen Variante. Unter den Wissenschaftlern ist man sich hinsichtlich des Begriffs der Mutation jedoch nicht einig, vielfach wird der Begriff der Mutation speziell für die Situation verwendet, dass Varianten im Erbgut während des Lebenszyklus eines Organismus neu auftreten.

Deletionen und Insertionen treten mit einer Häufigkeit von unter einer Million auf. Eine weitere Form angeborener erblicher Variation ist die CNV (engl.: *copy number variations*), die für eine Deletion und Duplikation größerer Abschnitte im Genom (1000 Basenpaaren bis hin zu mehreren 100.000 Basenpaaren) steht. Polymorphismen zeigen nicht nur einen Einfluss auf die Aufnahme oder der Wirkungen eines Arzneistoffs auf den Organismus. Sie können insbesondere bei der Vorhersage der therapeutischen Wirkung und der Vorhersage eventueller individueller Risiken eines Arzneistoffs eine Rolle spielen (Evans and McLeod, 2003). Genetisch bedingte Polymorphismen finden sich nicht nur in den Genen, die Transportproteine kodieren, sondern auch beispielsweise in den Genen für die Enzyme, die beim Metabolismus von Arzneistoffen eine bedeutende Rolle spielen (Brockmoller and Tzvetkov, 2008). Hinweise auf interindividuelle Unterschiede der metabolischen Aktivität und auf Polymorphismen finden sich bei fast allen Enzymen der Phase I- sowie Phase II-Reaktionen. Bereits Untersuchungen in den siebziger Jahren zeigten dies eindrucksvoll am Beispiel der Spartein-/Debrisoquin-Metabolisierung. Dabei zeigte sich in den Studien zu den damals aktuellen Medikamenten Spartein und Debrisoquin, dass bei dem Isoenzym CYP2D6 der Großteil der Menschen eine typische hohe (ca. 55%) oder intermediäre (ca. 30%) Aktivität aufwiesen wohingegen ein niedriger Prozentsatz der Menschen ultraschnelle Metabolisierer (UM; „extensive“, bei den meisten europäischen Bevölkerungen ca. 3%) oder langsame Metabolisierer (PM; poor metaboliser, bei den meisten europäischen Bevölkerungen ca. 10%) waren. In den weiteren Untersuchungen zeigte sich dass Patienten mit einer niedrigen Metabolisierungsrate für Debrisoquin sowie Spartein eine Vielzahl von Arzneistoffen, bei denen CYP2D6 an der Metabolisierung mitwirkt, mit geringer Geschwindigkeit eliminieren (Eichelbaum et al., 1975; Mahgoub et al., 1977). Ebenso können genetische Polymorphismen in Transportproteinen deren Expression oder Substrataffinität beeinflussen. Dadurch können sich die Absorption, die Verteilung sowie die Elimination des Arzneistoffs verändern. Genetische Polymorphismen können ausschlaggebende Auswirkungen auf die pharmakokinetische Variabilität von Arzneistoffen haben (Koepsell et al., 2007; Lynch and Price, 2007; Sachse-Seeboth et al., 2009). Für die Entstehung von Krankheiten spielen angeborene erbliche Variationen eine besondere Rolle. Dieses Gebiet wird heute oft auch als genetisch

sche Epidemiologie bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist die Sichelzellanämie. Die Sichelzellanämie ist eine Erkrankung der roten Blutkörperchen, den Erythrozyten. Dabei liegt eine Punktmutation am Chromosom 11 an Codon 6 der β -Globin-Untereinheit des Hämoglobin vor, wobei es zu einem Austausch der hydrophilen sauren Aminosäure Glutaminsäure gegen die hydrophobe Aminosäure Valin kommt. Dies führt zu einer Veränderung der Form der Erythrozyten, die sich sichelförmig verformen, sich in den Kapillaren ansammeln und dort lysieren. Dabei kommt es zum Austritt von Hämoglobin, des Enzyms Araginase sowie freier Sauerstoffradikale aus den Erythrozyten. Das ausgetretene Hämoglobin bindet stark an Stickstoffmonoxid. Das Enzym Araginase wandelt Stickstoffmonoxid in Nitrat und Nitrit um. Dadurch kommt es zu einer geringeren Konzentration an Stickstoffmonoxid, das wiederum als Vasodilator in den Gefäßen und Kapillaren wirkt. Dies wiederum führt zu Durchblutungsstörungen und Gefäßverengungen, Milzinfarkt, Nierenversagen bis hin zum Herzversagen beim Patienten (Estler, 2006; Mutschler, 2013). Homozygote Träger der Sichelzellanämie zeigen eine weitaus höhere Ausprägung der Erkrankungen als heterozygote Träger. Patienten, die eine Sichelzellanämie aufweisen, zeigen hingegen einen gewissen Schutz gegen die Malariaerkrankung (Ferreira et al., 2011).

1.2 Pharmakokinetik von Arzneistoffen

Alle nachfolgenden Erläuterungen zur Pharmakokinetik sind aus folgender Literatur: (Estler, 2006; Langner, 2011; Mutschler, 2013; Thews, 1999). Die Pharmakokinetik beschreibt die Veränderung der Konzentration eines Arzneistoffs in unterschiedlichen Kompartimenten eines Organismus in Abhängigkeit von der Zeit. Sie kann durch vier Prozesse beschrieben werden, die unter dem Akronym ADME (Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination) zusammengefasst sind. Dabei unterteilt man in Influxtransport, Phase I-Metabolismus, Phase II-Metabolismus und Effluxtransport. Der Phase I-Metabolismus umfasst die oxidativen und reduktiven Reaktionen, wohingegen unter dem Phase II-Metabolismus die Konjugationsreaktionen fallen. Der Influxtransport in die Zelle erfolgt durch Wasserporen, passive Diffusion, Ionenkanäle sowie durch SLC-Transporter, auch *solute carrier* genannt. Letztere benutzen in einigen Fällen die von ATPasen geschaffenen Substanzgradienten. ATPasen hydrolysieren an der Innenseite der

Membran ATP zu ADP und Phosphat. Die daraus entstandene Energie wird für den aktiven Transport der Substanz gegen das Konzentrationsgefälle durch die Membran genutzt. Für den Effluxtransport sind ABC-Transporter zuständig, die für ihre Aktivität Stoffwechselenergie in Form von ATP verbrauchen. Ihren Namen tragen sie aufgrund ihrer ATP-bindenden Kassetten (ATP-binding cassette). Sie befördern Substanzen aus dem Inneren einer Zelle in den Extrazellulärraum. Die Transportvorgänge Influx und Efflux können gegensätzlich sein, laufen aber in der Regel abgestimmt ab. Die **Abbildung 1-1** stellt die schematische Darstellung der Prozesse in einer Zelle dar. Dabei gelangt der Arzneistoff in die Zelle, wird beispielsweise an seiner aliphatischen Kette oxidiert und anschließend mit aktiviertem Sulfat konjugiert und aus der Zelle befördert.

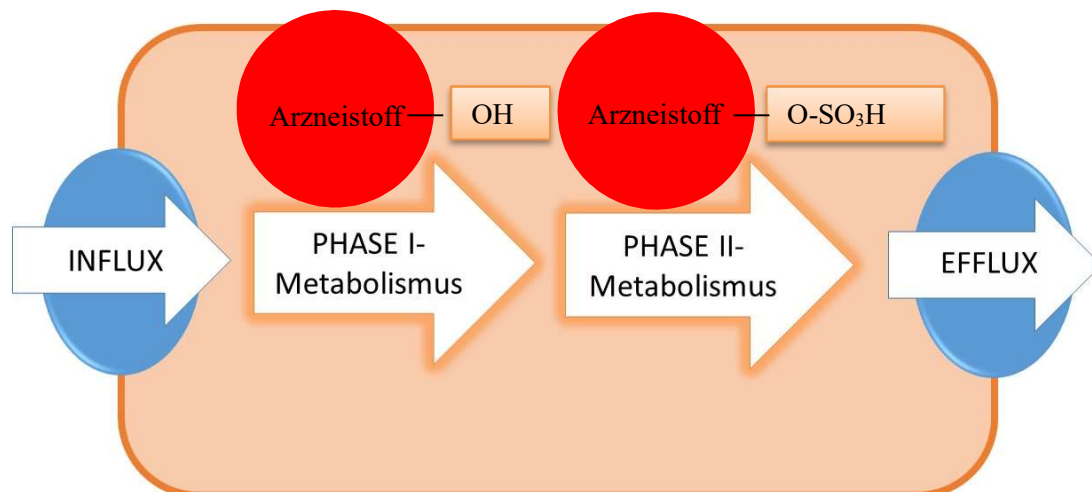


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Prozesse in einer Zelle

Um aufgenommen, metabolisiert und ausgeschieden zu werden und um eine Wirkung im menschlichen Organismus auszulösen, müssen viele Arzneistoffe in die Zellen gelangen. Die Mehrzahl der Medikamente wirkt außen auf die Zelle, ein kleiner Teil der Medikamente greift an interzelluläre Rezeptoren an. Für die Resorption, die Verteilung und auch die Elimination ist die Penetration durch Membranen unausweichlich. Eine besondere Rolle dabei spielen Zellmembranen. Die Möglichkeit eines Arzneistoffs Zellmembranen zu passieren, bestimmt zunächst seine Fähigkeit, an den Zielort zu gelangen, metabolisiert oder ausgeschieden zu werden. Zellmembranen bestehen überwiegend aus Lipiden und

Proteinen. Nachdem Arzneistoffe die Zellmembran durchdrungen haben, werden sie entweder verstoffwechselt oder gelangen an ihren Wirkungsort und werden später eliminiert. Verschiedene Möglichkeiten der Penetration stehen dem Arzneistoffen zur Auswahl, jedoch können nur bestimmte Wege ausgeschöpft werden. Transportprozesse von Arzneistoffen, welche durch die Zellmembran stattfinden, haben neben den enzymvermittelten Interaktionen einen Einfluss auf die Pharmakokinetik, Toxizität sowie Effektivität des Arzneistoffs. Eine der Möglichkeiten ist der vesikuläre Transport, bei dem Makromoleküle durch Einschnürungen durch die Membran in das Zellinnere eingeschleust werden können (Endozytose) und ähnlich auch wieder ausgeschleust werden können (Exozytose). Weitere Möglichkeiten sind im Folgenden beschrieben:

1.2.1 Diffusion durch biologische Membranen

Eine Möglichkeit der Penetration durch Zellmembranen ist die passive Diffusion. Sie ist ein physikalisch-chemischer Prozess, bei dem die Substanz in die Lipidschicht der Membran diffundiert und auf der Membraninnenseite hinaus in die wässrige Phase diffundiert. Die passive Diffusion kann in beide Richtungen verlaufen. Dies kann durch das 1. Fick'sche Gesetz (**Gleichung 1-1**) dargestellt werden:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

Gleichung 1-1: 1. Fick'sches Gesetz

J = Teilchenstromdichte [$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

D = Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]

$\frac{\partial c}{\partial x}$ = Konzentrationsgradient [mol m^{-4}]

Das 1. Fick'sche Gesetz sagt aus, dass die Teilchenstromdichte J proportional zum Konzentrationsgradienten und entgegen der Diffusionsrichtung ist. Die Proportionalitätskonstante ist der Diffusionskoeffizient D .

Die Menge des diffundierten Arzneistoffs pro Zeit ist proportional zum Permeabilitätskoeffizienten, der Membranoberfläche sowie zum Konzentrationsunterschied des Stoffes zwischen der Innenseite und der Außenseite der Membran. Dies wird mit der Gleichung 2-13 zur Bestimmung der Membranpermeabilität am Beispiel des PAMPA-Assays (**Gleichung 2-9**) beschrieben.

Es zeigt sich, dass die treibende Kraft der passiven Diffusion der Konzentrationsgradient ist. Die Arzneistoffmenge, die in die Zelle gelangt, steht im linearen Zusammenhang zum Konzentrationsgradienten. Ferner ist die chemische Struktur eines Arzneistoffs bei der passiven Diffusion ein wichtiges Kriterium. Arzneistoffe verhalten sich aufgrund ihrer Struktur unterschiedlich bezüglich ihrer Löslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln. beschrieben. Der Löslichkeitsunterschied des Arzneistoffs wird durch den Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten P dargestellt. In der Literatur wird der Verteilungskoeffizient P logarithmiert. Dadurch können stark ansteigende Zahlenreihen übersichtlich dargestellt werden, da im Gegensatz zu den großen Zahlen der Logarithmus langsamer ansteigt. Der Verteilungskoeffizient beschreibt die Verteilung der Konzentration eines Arzneistoffs (c) zwischen einem hydrophoben (O) und einer hydrophilen Phase (W), auch als Oktanol-Wasser-System bezeichnet. Dabei wird wegen des großen Bereiches, den dieser einnehmen kann, der Verteilungskoeffizient oft als dekadischer Logarithmus ($\log P$) angegeben:

$$P = \frac{CO_{S1} + CO_{S2} + CO_{S3} + CO_{Sn}}{CW_{S1} + CW_{S2} + CW_{S3} + CW_{Sn}}$$

$$\log P = \log \frac{CO}{CW}$$

Gleichung 1-2: Berechnung des log P-Wertes

$\log P$ = Verteilungskoeffizient

CO = Arzneistoffkonzentration in der Oktanol-Phase

CW = Arzneistoffkonzentration in der Wasser-Phase

S = Anzahl der Arzneistoffspezies in der jeweiligen Phase

Der $\log D$ -Wert kann herangezogen werden, wenn es sich um die Beschreibung der Löslichkeit von Arzneistoffen mit schwach sauren oder basischen Eigenschaften handelt.

$$\log D = \log \frac{c_o}{c_w}$$

$\log D$ = Verteilungskoeffizient

c_o = Arzneistoffkonzentration in der Oktanol-Phase

c_w = Arzneistoffkonzentration in der Wasser-Phase

S = Anzahl der Arzneistoffspezies in der jeweiligen Phase

Gleichung 1-3: Berechnung des $\log D$ -Wertes

Die Werte für den Verteilungskoeffizient P sind vom pH-Wert der wässrigen Phase überwiegend unabhängig, wohingegen die Werte des Verteilungskoeffizienten D oft vom pH-Wert der wässrigen Phase abhängig sind.

1.2.2 Protein-vermittelter Transport

Stoffe mit einem negativen oder niedrigen $\log D$ -Wert besitzen in der Tendenz einen niedrigen Permeabilitätskoeffizienten und sind somit kaum in der Lage, die passive Diffusion zum Transport in die Zelle effizient nutzen zu können. Der passive Transport ist nicht sättigbar, stellt sich ab dem Zeitpunkt, ab dem sich ein Gleichgewicht zwischen der Innen- und Außenseite der Membran eingestellt hat ein und verbraucht keine Stoffwechselenergie. Eine weitere Möglichkeit eines Arzneistoffs oder einer Substanz, durch die Zellmembran in das Zellinnere zu gelangen, ist der selektive Transport mittels Transportproteinen. Diese sind in oder auf der Zellmembran. Beim Transport durch die Zellmembran wird zwischen Carrier, Kanälen und Pumpen unterschieden. Sie besitzen einige Gemeinsamkeiten, wie eine Transportspezifität, Hemmbarkeit, Aktivierbarkeit sowie eine

Sättigungskinetik (Thews, 1999). Carrier sind Proteine, die sich selektiv an den zu transportierenden Stoff binden und diesen durch die Membran befördern. Carrier-vermittelter Transport verläuft nach der Michaelis-Menten-Kinetik und ist sättigbar. Man unterscheidet hier zwischen Symporter, Antiporter und Uniporter.

Transportkanäle bestehen aus Proteinen oder Proteinkomplexen, die sich durch die Membran erstrecken und die Durchlässigkeit von Wasser oder anorganischen kleinen Molekülen zulassen. Pumpen hingegen beschreiben eine Form des aktiven Transports. Ein Beispiel dafür ist die Na^+/K^+ Pumpe, auch Na^+/K^+ -ATPase genannt. Diese gewinnt durch die Spaltung von ATP zu ADP und Phosphat Energie, die sie wiederum für den Austausch von 3 Na^+ gegen 2 K^+ nutzt. Daraus ergibt sich ein stetiger Transport von einer positiven Ladung aus der Zelle heraus (Mutschler, 2013).

1.2.3 Organische Basen und organische Säuren

Der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Aufnahme eines Arzneistoffes. Die Struktur und die sich daraus ergebene Säure- oder Basenstärke des Arzneistoffs haben ebenso einen Einfluss auf die Pharmakokinetik. Der Großteil der zum Einsatz kommenden Arzneistoffe sind Moleküle mit schwach basischen oder sauren Eigenschaften. Schwach basische Arzneistoffe sind oft organische Arzneistoffe mit einer chemischen Struktur, die eine Aminogruppe der primären, sekundären oder tertiären Art aufweisen. Aminogruppen weisen eine erhöhte Basizität auf und besitzen p_{KS}-Werte größer 10. Je kleiner der p_{KS}-Wert ist, desto stärker ist die Säure. Der p_{KS}-Wert spielt bei der Aufnahme, der Verteilung, der Metabolisierung und der Elimination des Arzneistoffs bei Vorliegen der protonierten und unprotonierten Form bei physiologischem pH-Wert eine entscheidende Rolle.

Im menschlichen Organismus spielen Puffersysteme im physiologischen Bereich, d.h. pH = 7,4, eine entscheidende Rolle. Ein Puffersystem besteht aus einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base.

$$\frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]} = K'$$

Gleichung 1-4: Gleichung der Dissoziationskonstanten

Die in Klammern gesetzten Buchstaben sind molare Konzentrationen, K' beschreibt die Dissoziationskonstante oder auch Gleichgewichtskonstante. Das H^+ steht für die Säure, A^- für die korrespondierende Base.

Damit sich ein Gleichgewicht zwischen der schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base einstellt und das Massenwirkungsgesetz gelten kann, muss eine Erhöhung des Anteils der Konzentration an H^+ -Ionen mit einem Anstieg des Anteils der Konzentration undissoziierter Säure einhergehen. Somit kommt es zu einer Zurückdrängung der Dissoziation. Der vermehrte Anteil an H^+ -Ionen wird durch die freien Anionen gebunden. Dadurch kommt es zu einer geringen Erhöhung des pH-Wertes. Sowohl die Erhöhung als auch die Erniedrigung der H^+ -Konzentration haben somit nur eine geringe Auswirkung in einem Puffersystem. Um den Effekt eines Puffersystems (**Gleichung 1-5**) zu erläutern, bedarf es der Umstellung und des Logarithmierens der obigen Formel, die in (**Gleichung 1-4**) dargestellt wird. Der pH-Wert lässt sich mit der Gleichung aus (**Gleichung 1-6**) bestimmen.

$$\frac{-\log[H^+] = -\log K' - \log[HA]/[A^-]}{}$$

Gleichung 1-5: Gleichung eines Puffersystems

$$\frac{pH = pK_s + \log[A^-]/[HA]}{}$$

Gleichung 1-6: Gleichung zur Berechnung des pH-Wertes

Die **Gleichung 1-6** entspricht dem Massenwirkungsgesetz eines Puffersystems und wird auch als Henderson-Hasselbalch-Gleichung bezeichnet.

1.2.4 Membrantransport protonierter und nichtprotonierter Arzneistoffe

Nach obiger Beschreibung (**Kapitel 1.2.3**) kann erklärt werden, wie Arzneistoffe, die in ihrer Molekülstruktur verschiedene funktionelle Gruppen tragen, innerhalb eines Puffersystems vorliegen können. Sie liegen entweder protoniert, unprotoniert oder nur kaum protoniert vor. Die nichtprotonierte Form eines Arzneistoffs mit schwach basischer Struktur passiert die Membran durch die nichtionische Diffusion (Milne et al., 1958). Je nach Größe des Permeabilitätskoeffizienten passiert die unprotonierte Form die biologische Membran, solange ein Konzentrationsgradient besteht. Auf der gegenüberliegenden Seite wird die unprotonierte Form nach der Passage durch die Membran protoniert und liegt positiv geladen vor. Die nichtionische Diffusionstheorie beschreibt, dass die Gleichheit des pH-Wertes auf beiden Seiten der Membran dazu führt, dass beide Formen des Arzneistoffs, sowohl die protonierte als auch die unprotonierte Form, in gleichen Konzentrationen vorliegen. Heute kann die nichtionische Diffusion durch unterschiedliche Formen des Carrier-vermittelten Transports für den protonierten Arzneistoff ergänzt werden. Somit existieren zwei Wege zur Penetration von schwach basischen Arzneistoffen durch Zellmembranen.

Zum einen ist es die passive Diffusion, zum anderen der Carrier-vermittelte Transport. Bei beiden Theorien ist die Menge des penetrierenden Stoffes unter anderem abhängig von der chemischen Struktur, des pH-Wertes auf beiden Seiten der Membran sowie vom Vorhandensein eines Transportproteins. Carrier-vermittelter Transport wird in vielen Fällen quantitativ relevant, wenn weniger als 10% der schwach basischen Arzneistoffe unprotoniert vorliegen (Palm et al., 1999).

Somit kann zusammengefasst werden, dass sehr lipophile Arzneistoffe die Zellmembran durch passive Diffusion passieren können, sehr hydrophile Arzneistoffe einen Carrier-vermittelten Transport benötigen und Arzneistoffe, die schwach basische oder saure Eigenschaften zeigen, sowohl die passive Diffusion als auch den Carrier-vermittelten Transport nutzen können. Das Verständnis und die Wirkweise der polyspezifischen Transporter, also Transporter, die viele verschiedene Moleküle mit unterschiedlicher Struktur, Größe sowie Hydrophilie binden können, setzt das Wissen über die strukturelle Grundlage polyspezifischer Bindungen voraus. Zudem sollte geklärt werden, wie organische Kationentransporter mit strukturell unterschiedlichen Molekülen interagieren und

diese letztendlich transportieren. Bekannt ist, dass die organischen Kationentransporter nach einem *alternating access*-Mechanismus, also einem sich ändernden Zugangsmechanismus, arbeiten (**Abbildung 1-2**).

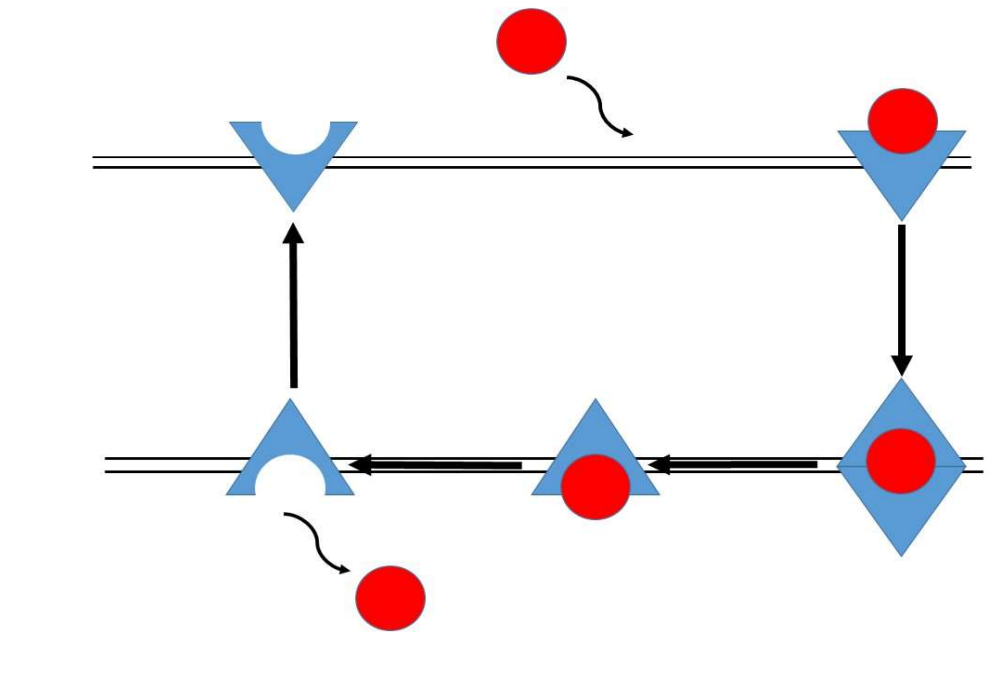


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Transportzyklus

Substrat ● und Transporter 

Der Ablauf erfolgt folgendermaßen: Das Substrat positioniert sich an der Bindestelle. Die Interaktion des Substrats mit der Bindestelle führt zur Konformationsänderung des Transporters, die zu einer Neuorientierung der Bindestelle führt. Dabei kann es zu einer erhöhten Affinität zur intrazellulären Seite der Membran führen und das Substrat intrazellulär entlassen (Shimamura et al., 2010). Anschließend nimmt der Transporter seine ursprüngliche Konformation wieder ein und ein erneuter Transport kann stattfinden. Auch Engenberger (Egenberger et al., 2012) beschreibt die Konformationsänderung des OCT1, bei dem durch die Bindung eines Substrats der Transport durch den Transporter von außen nach innen erfolgt. Es kann somit vermutet werden, dass die Affinität und Bindung eines Substrats an die organischen Kationentransporter über verschiedene Bindungen erfolgen kann und auch von der Struktur des Substrats abhängig sein kann.

1.3 Organische Kationentransporter

Mehr als 40% der oral verabreichten Arzneistoffe besitzen schwach basische Eigenschaften und liegen im physiologischen pH-Wert protoniert vor (Neuhoff et al., 2003). Ein Beispiel zeigt das Antidiabetikum Metformin, das durch humanes OCT2 (hOCT2) transportiert wird, jedoch seine Wirkung bei bestimmten Patienten, welche Polymorphismen von hOCT2 aufweisen, nicht ausbilden kann. Im menschlichen Organismus sind viele Transporter bekannt, welche den Transport von schwach organischen Basen vermitteln. Diese sind beispielsweise die *Multidrug and toxic compound extrusion transporters* **MATE1** und **MATE2-K**, zugehörig der solute carrier- family **SLC47-Familie**, sowie die elektrogenen organischen Kationentransporter **OCT1**, **OCT2**, **OCT3**, die vom Membranpotential abhängig und unabhängig von Na^+ , Cl^- und womöglich auch vom H^+ -Ionengradienten sind, zuzüglich der Carnitin-Kationentransporter **OCTN1** und **OCTN2**, die das Zwitterion Carnitin und auch andere organische Kationen transportieren. Sie gehören zu der solute carrier **SLC22-Familie** (**Abbildung 1-4**). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Verteilung und Exkretion von organischen Kationen im Organismus.

Ihre Substrate sind positiv geladene organische Kationen, Monoamino-Neurotransmitter sowie endogene Substrate (Koepsell et al., 2003; Nies et al., 2011). Auch schwach basische organische Arzneistoffe, die beim physiologischen pH-Wert positiv geladen vorliegen, können transportiert werden (Barendt and Wright, 2002). Inhibitoren, die nicht transportiert werden, können eine große Zahl an geladenen oder ungeladenen Molekülen sein, die entweder an peripheren Positionen des OCTs oder an der Substratbindetasche binden. (Koepsell et al., 2003). Die Funktion der OCT1 und OCT3 in der Leber besteht darin, den primären Schritt der Aufnahme von kationischen körpereigenen Substanzen oder Xenobiotika über die sinusoidale Membran in die Hepatozyten zu begünstigen. Organische Kationen können über die OCT reversibel in beide Richtungen transportiert werden (**Abbildung 1-3**) (Koepsell, 2004). Die aufgenommenen organischen Kationen können anschließend in den Gallengang über H^+ -Kationenantiporter und/oder P-Glykoprotein MDR-1 ausgeschieden werden.

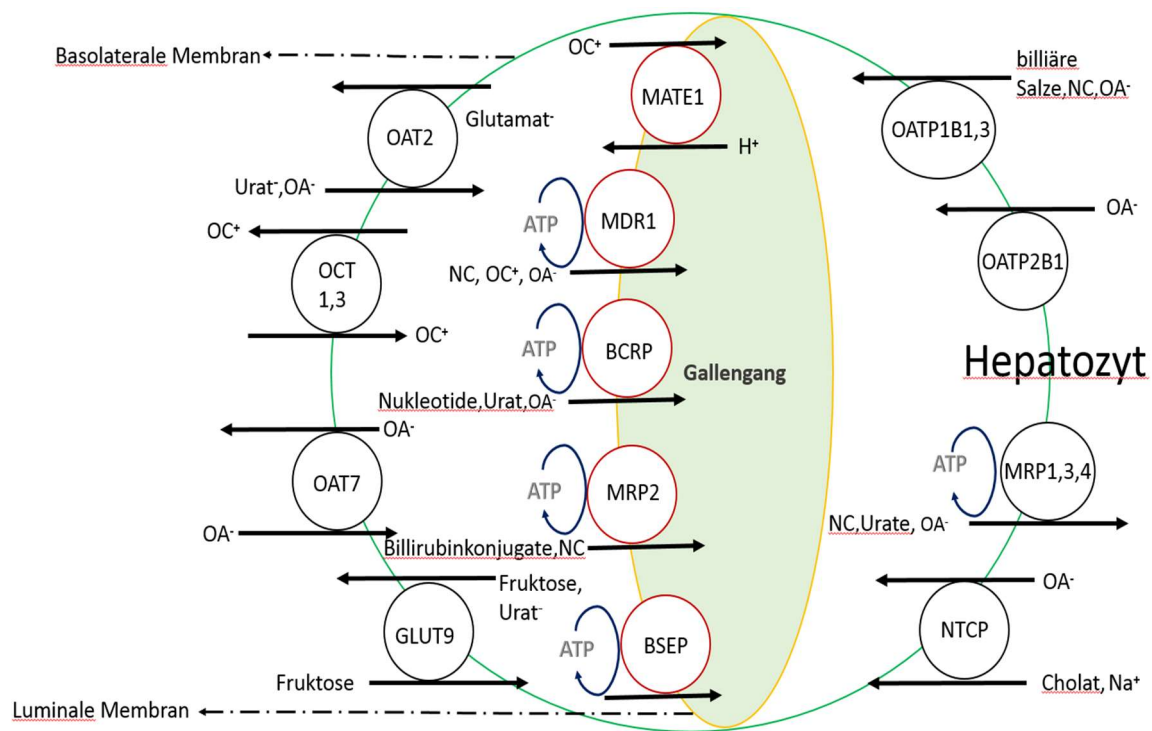


Abbildung 1-3: modifizierter Transport Organischer Kationen (OC) in Hepatozyten

(modifiziert nach (Koepsell et al., 2003))

MDR	Multiple drug resistance proteine
MRP	Multidrug resistance-associated proteine
BCRP	Breast Cancer resistance proteine
BSEP	Bile salt export pump
OAT	Organic anionic transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
GLUT	Glucosetransporter
NTCP	Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
OCT	Organic cationic transporter

Weitere Transporter (in Eng.) die für den Influx- und Effluxtransport in und aus der Leberzelle verantwortlich sind, wurden ebenfalls schematisch in **Abbildung 1-3** dargestellt.

Organische Kationen werden je nach Konzentration im Plasma sekretiert oder rückresorbiert

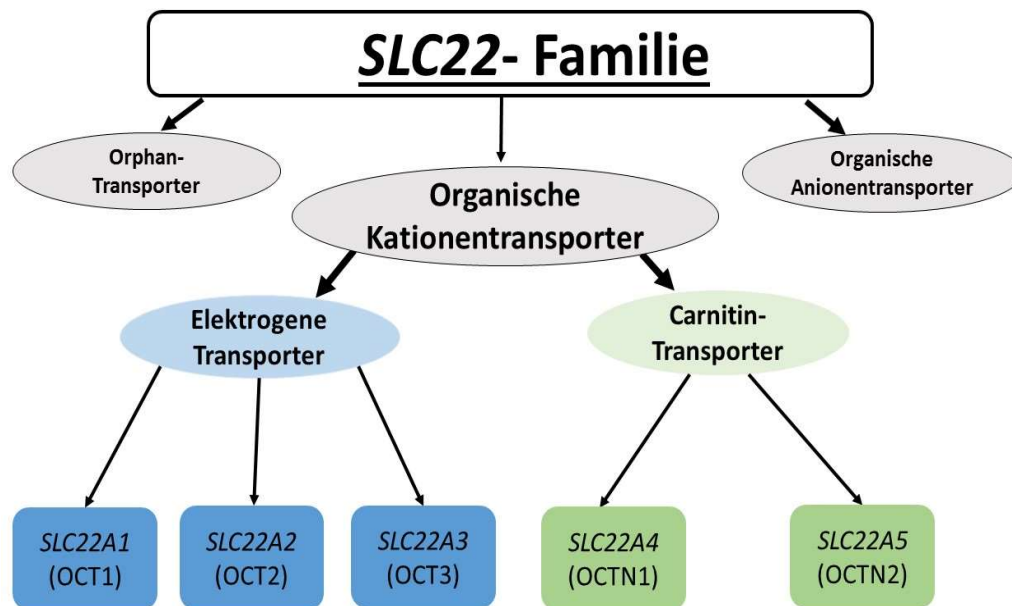


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der SLC22-Familie

1.3.1 Struktur und Funktion der organischen Kationentransporter (OCTs)

Die Gene von OCT1 bis OCT3 sind beim Menschen auf dem Chromosom 6q26-27 lokalisiert (Koehler et al., 1997). Die Aminosäuresequenzen der jeweiligen OCTs innerhalb einer Spezies stimmen bei OCT1 und OCT2 prozentual zu 67-70%, bei OCT1 und OCT3 zu 47-57% überein (Koepsell et al., 2003). Die organischen Kationentransporter sind elektrogen, abhängig vom Membranpotential und nicht abhängig von Cl^- , H^+ , Na^+ -Ionengradienten (Budiman et al., 2000; Busch et al., 1996; Schmitt and Koepsell, 2005). Dabei bedeutet elektrogen, dass die Bindung des Arzneistoffs an den Transporter zu einem Aufbau einer elektrischen Spannung und einer Erhöhung des Membranpotentials führt.

Als erster Kationentransporter wurde 1994 OCT1 anhand des rOCT1 der Ratte erforscht (Grundemann et al., 1994). Binnen kurzer Zeit wurde sodann der organische Kationentransporter OCT2 aus einer Rattenniere isoliert und identifiziert (Okuda et al., 1996). OCT2 besteht aus 593 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt 66k Da (Jonker and

Schinkel, 2004). OCT3 wurde zwei Jahre später kloniert (Kekuda et al., 1998). Im Jahr 1997 wurden humanes OCT1 und OCT2 erfolgreich kloniert und charakterisiert (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997). Die Grundstruktur der OCTs ist eine Peptidkette, es besitzt 12 Transmembrandomänen, eine große extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne sowie eine große intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne (**Abbildung 1-5**). Die große extrazelluläre Schleife liegt glykolysiert vor und enthält zur korrekten subzellulären Lokalisation und Oligomerisierung Disulfidbindungen (Keller et al., 2011; Nies et al., 2011), was an den OCT1-Transportern von Ratten erforscht wurde. Die große intrazelluläre Schleife besitzt einige Stellen zur Phosphorylierung. Diese werden vermutlich durch die Proteinkinase C phosphoryliert (Burckhardt and Wolff, 2000; Koepsell et al., 2007), die an der kurzzeitigen Regulierung der Aktivität des OCT1-Transporters beteiligt ist (Cetinkaya et al., 2003; Ciarimboli et al., 2005; Ciarimboli and Schlatter, 2005). Intrazellulär befinden sich das N- und C-terminale Ende (Jonker and Schinkel, 2004; Koepsell, 2004).

Ausgehend von Untersuchungen an OCT1 von Ratten zeigte sich, dass eine Substratidentifizierung durch die Transmembrandomäne 11 durch den Austausch von Aspartat an Position 475 durch Glutamat stark beeinflusst werden kann (Gorboulev et al., 1999). Ebenso ist anzunehmen, dass an der obigen Transmembrandomäne eine Substratbindestelle für die Substrattranslokation bedeutsam ist (Egenberger et al., 2012). Die Transmembrandomäne 4 zeigt ebenfalls durch den Austausch von Aminosäuren an den Positionen 218, 222 und 226 der Peptidkette wie bei der Transdomäne 11 erhöhte K_M -Werte (Popp, Gorboulev et al. 2005). Somit kann vermutet werden, dass es mehrere verschiedene Bindestellen gibt, die für eine Translokation eines Substrats von Bedeutung sein können (Koepsell, 2011).

OCT1 wird am häufigsten in der Leber exprimiert (Gorboulev et al., 1997; Nies et al., 2009; Nishimura and Naito, 2005; Zhang et al., 1997). Nachgewiesen wurde zudem, dass sich OCT1 in der basolateralen Membran der Hepatozyten befindet (Nies et al., 2008). Hier trägt der OCT1-Transporter zum ersten Schritt der Exkretion kationischer endogener Substanzen und Xenobiotika mit bei (Koepsell, 2004). Ferner findet sich OCT1 in der

luminalen Membran des distalen und proximalen Tubulus der Niere (Tzvetkov et al., 2009).

Der organische Kationentransporter OCT2 wird im Gehirn, in der Lunge, im Dünndarm aber überwiegend in der Niere exprimiert (Gorboulev et al., 1997). OCT2 ist beim primären Schritt der renalen Elimination der kationischen Substanzen und Xenobiotika entscheidend. Der erste Schritt der Sekretion erfolgt über den Influxtransport von Substraten über die basolaterale Membran der proximalen Tubuluszellen (Koepsell et al., 1999). Der anschließende luminale Effluxtransport erfolgt über OCTN1, OCTN2 oder auch OCT1. Aus den Tubuluszellen erfolgt die Exkretion über OCT2 (Koepsell, 2004). Der organische Kationentransporter OCT3 wurde 1998 identifiziert (Kekuda et al., 1998; Wu et al., 1998a). Dieser hat eine hohe Expression in der Leber, der Skelettmuskulatur, in der Plazenta, im Gehirn sowie im Herzmuskel und in den Ovarien und der Plazenta (Nies et al., 2009; Sata et al., 2005). Die Expression von OCT1 in der Leber ist mehr als zehnmal höher als die des OCT3-Transporters (Nies et al., 2009).

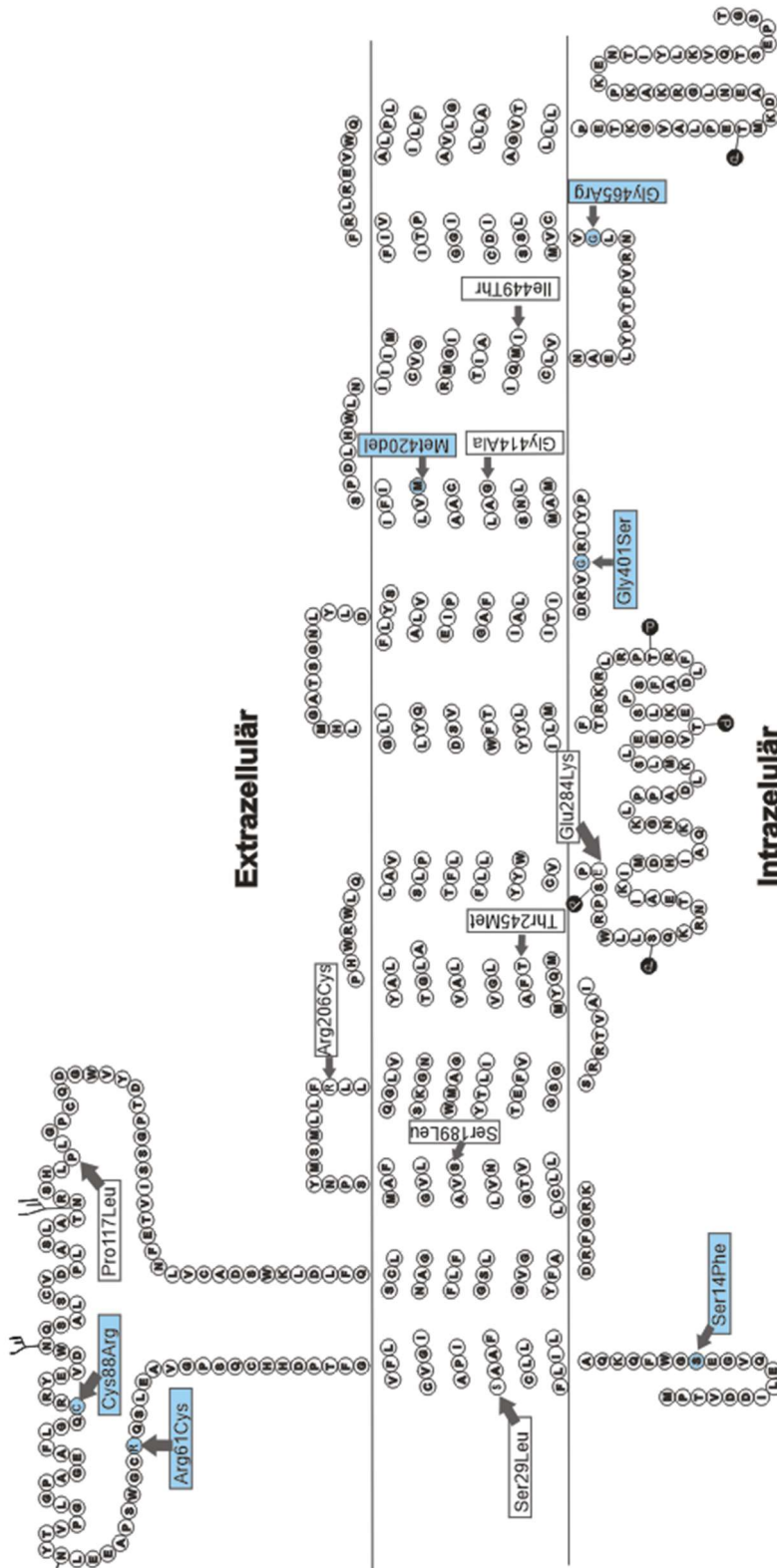


Abbildung 1-5: Membrantopologie des organischen Kationentransporters 1 (OCT1).

(modifiziert nach Seitz, T et al, 2015), weiße Kästchen: SNPs des OCT1, blaue Kästchen: die in der Dissertation untersuchten SNPs

Weitere Verteilungen der OCT1-3 sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1-1: Verteilung des OCT Transporter im menschlichen Körper

(modifiziert nach Koepsell et. Al. und Urban 2007)

Menschliche Organe	OCT1	OCT2	OCT3
Fötale Leber	✓	-	-
Fötale Lunge	✓	-	-
Fötales Gehirn	✓	-	-
Fötales Herz	✓	-	-
Pankreas	-	-	✓
Dünndarm	✓	✓	-
Eierstöcke	✓	-	✓
Fettgewebe	✓	-	-
Gehirn	-	✓	✓
Herz	✓	-	✓ ✓
Leber	✓ ✓ ✓	-	✓
Lunge	✓	✓	✓
Plazenta	✓	-	✓ ✓
Nebenniere	✓	-	-
Niere	✓	✓ ✓ ✓	✓
Rückenmark	-	-	✓
Skelettmuskulatur	✓ ✓	-	✓ ✓
Erythrozyten	?	?	?

Die in Tabelle 1-1 aufgeführten Häkchen [✓] stellen die Intensität der Expression in den einzelnen menschlichen Organen dar. In den Erythrozyten ist das Vorhandensein der OCTs nicht erforscht.

Weiterhin gehören die Carnitin-Kationentransporter OCTN1, OCTN2 zur Familie der SLC22-Transporter. Die Gene für OCTN1 sowie OCTN2 sind beim Menschen auf dem Chromosom 5q23.3 lokalisiert. OCTN1 sowie OCTN2 können neben Carnitin auch am Transport von organischen Kationen engagiert sein (Tamai et al., 1998; Tamai et al., 1997; Wu et al., 1998b). OCTN1 wird in der Niere, der Skelettmuskulatur, der Plazenta, der Prostata sowie im Herzen (Tamai et al., 1997) exprimiert, OCTN2 in der Niere, der Lunge, der Leber, der Schilddrüse, der Skelettmuskulatur sowie im Pankreas und dem Herzen exprimiert (Wu et al., 1998b).

Alle organischen Kationentransporter transportieren übereinstimmend organische Kationen mit unterschiedlichster Struktur, sowie bei physiologischem pH-Wert positiv geladene schwache Basen. Die organischen Kationen sind in der Regel nur solche mit einem Durchmesser unter 4 Å und einem Molekulargewicht unter 500 Da (500 g/mol) (Koepsell et al., 2007; Koepsell et al., 2003). Es gibt bereits eine Vielzahl von Substraten, die über die organischen Kationentransporter ihren Weg in die Zellen finden (Dos Santos Pereira et al., 2014; Koepsell et al., 2007; Saadatmand et al., 2012; Tzvetkov et al., 2013). Die zur Charakterisierung der Funktionalität der organischen Kationentransporter herangezogenen Substrate sind beispielweise Tetraethylammonium (TEA^+) oder Methylphenylpyridinium (MPP^+). Ebenso können endogene Stoffe über sie transportiert werden (Koepsell et al., 2007). Arzneistoffe dienen auch als Inhibitoren der organischen Kationentransporter. Hierfür sprechen eine erhöhte Lipophilie sowie ein Dipolmoment. Die Affinität zur Ausbildung von größeren Mengen an Wasserstoffbrückenbindungen führt zu keinem verbesserten Transport (Ahlin et al., 2008). Katecholamine wie Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin sowie die Neurotransmitter Histamin, Serotonin, Acetylcholin sowie N-Methylcholin scheinen den organischen Kationentransporter zu inhibieren. Da es Überlappungen in der Struktur der OCTs gibt, kann bzgl. der Bindung eines Inhibitors oder eines Substrats an einer Isoform nur erschwert eine Aussage getroffen werden. Letztlich wird trotz allem eine große Anzahl an Publikationen veröffentlicht wie beispielsweise (Dos Santos Pereira et al., 2014; Saadatmand et al., 2012; Seitz et al., 2015; Tzvetkov et al.,

2013). Es zeigt sich jedoch auch, dass die genetische Variabilität eine wichtige Rolle spielt.

1.4 Genetische Varianten des OCT1

In dem für das Transportprotein OCT1 kodierenden Gen existieren viele erbliche Polymorphismen. Es zeigt sich insbesondere eine Reihe von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), deren Häufigkeit je nach Abstammung der Träger variiert. Diese wurden durch die Analyse des SLC22A1, des Gens, das für OCT1 codiert ist, identifiziert. Einige dieser SNPs treten in den codierten Regionen des OCT1-Gens auf, was wiederum zu einem Austausch oder der Deletion einer Aminosäure führt. Kerb et. al zeigten 2002, dass in einem Beispiel von 57 gesunden Probanden kaukasischer Abstammung 25 genetische Varianten identifiziert wurden, wobei sich bei acht von ihnen eine Veränderung der Proteinsequenz zeigte. Folgende ausgewählte SNPs (Arg61Cys, Cys88Arg, Gly401Ser, Met420del) führten zur Abnahme der Transportaktivität. Einige der genannten SNPs weisen eine veränderte Substratspezifität auf, die die Bindung der Substrate an OCT1 verändern und somit die Dauer und Intensität der Arzneistoffe an OCT1 beeinflussen. Diese sind die Aminosäuredeletion Met420del sowie der Austausch von Aminosäuren bei Arg61Cys, Cys88Arg, Gly401Ser, Gly465Arg. Dagegen kommen Substitutionen der Aminosäuren an Positionen Cys88Arg und Gly465Arg nur gemeinsam in Verbindung mit der Aminosäuredeletion Met420del vor. Fünf SNPs wurden aufgrund ihrer vermehrten Häufigkeit innerhalb der kaukasischen Population analysiert (Arg61Cys, Cys88Arg, 420del, Gly401Ser, Gly465Arg). Einer der SNPs (Ser14Phe), welcher nicht bei den Kaukasiern auftritt, zeigt eine höhere Transportaktivität als andere SNPs (Kerb et al., 2002; Shu et al., 2003). Für die SNPs Cys88Arg und Gly401Ser zeigten sich substratspezifische Effekte (Kerb et al., 2002).

1.5 Proguanil und Cycloguanil

1.5.1 Medizinischer Hintergrund

Malaria ist die bedeutendste Protozoenerkrankung der Welt. Sie fordert laut einem Bericht der WHO vom Jahr 2012 jährlich weit über 600.000 Todesopfer. Die Prophylaxe ist neben der Chemotherapie bei einzelnen parasitären Entwicklungsstadien im Organismus wichtig. Zur Verhinderung des Ausbruchs der Erkrankung werden zur Prophylaxe Chemotherapeutika eingesetzt. Einfache Maßnahmen zum Schutz des Sticks wie beispielsweise ein Mosquitonetz, der Einsatz von Repellents oder entsprechender Kleidung sollten ebenfalls in Gebieten mit einem hohen Ansteckungsrisiko beachtet werden. Die Forschung nach Arzneistoffen im Kampf gegen die Malaria begann bereits in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts (Curd et al., 1945; Estler, 2006).

1.5.2 Pathogenese der Malaria

Die Form der Malariaerkrankung mit der höchsten Letalität zeigt sich bei der Malaria tropica, die durch den Erreger *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wird. Weitere Formen sind *Malaria tertiana* und *Malaria quartana*. Die Plasmodien werden durch den Stich der weiblichen Anopheles-Mücke übertragen. Dabei werden Sporozoiten, die sich im Speichel der Mücke befinden, in den menschlichen Organismus eingeschleust (**Abbildung 1-6**). Die Sporozoiten wandern in die Parenchymzellen der Leber und entwickeln sich dort durch mehrere Kernteilungen zu Merozoiten. Dieser Vorgang wird auch präerythrozytäre Schizogonie genannt. Anschließend erfolgt die Penetration der Merozoiten in die Erythrozyten, wo sie sich letztendlich durch weitere Teilungen vermehren. Dabei wird die Erythrozytenmembran so verändert, dass die Merozoiten ihren Abfall, welcher bei ihrer Vermehrung anfällt, ausschleusen können. Man nennt diesen Weg auch „new permeability pathway“. Für das Verständnis für die Angriffspunkte der Arzneistoffe sind die Struktur und der Aufbau der Erythrozyten von Bedeutung. Daher wird hier darauf näher eingegangen (Estler, 2006; Mutschler, 2013).

Erythrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen im menschlichen Körper. Gebildet werden die Erythrozyten im roten Knochenmark. Sie besitzen eine flache scheibenartige Form, sind bikonkav, haben keinen Zellkern oder jegliche Zellorganellen und teilen sich nicht. Ihre Lebensdauer beträgt bis zu 120 Tage und der Abbau erfolgt in der Milz, der Leber oder dem Knochenmark. Hauptsächlich bestehen sie aus Hämoglobin, dem roten Blutfarbstoff, der den Sauerstoff bindet. Dieser besteht aus einem Eiweißmolekül mit vier Polypeptidketten, auch Globin genannt, sowie einer eisenhaltigen Häm-Gruppe, die inmitten der Polypeptidketten sitzt. Die Aufgaben der Erythrozyten sind der Sauerstofftransport von der Lunge zum Herzen, der Kohlenstoffdioxidabtransport aus der Lunge sowie die Regulierung des pH-Wertes im Blut. Des Weiteren ist ihre Anzahl abhängig von dem Sauerstoffgehalt im Blut, der Tätigkeit und des Aufenthalts des Menschen, unabhängig ist ihre Anzahl von der Nahrungsaufnahme, der Jahreszeit oder der Temperatur(Mutschler, 2013).

Die Entwicklung der Erythrozyten erfolgt in folgender Reihenfolge:

Stammzelle → Proerythroblast → Erythroblast → Normoblast → Normozyt → Retikulozyt (noch unreife Erythrozyten) → Erythrozyt.

Die Erythrozytenmembran ist mit einer Reihe von Systemen für den Transport durch die Membran ausgestattet. Sie sind vermutlich Überreste von ihren Vorläuferzellen. Allein mindestens vier Mechanismen des Kaliumtransportes sind charakterisiert und bestimmt worden, wie die Na^+/K^+ -Pumpe, der $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}_2$ -Kotransporter, der K^+-Cl^- -Kotransporter sowie der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal (Bernhardt et al., 1991). Aminosäuren penetrieren durch die Erythrozytenmembran durch verschiedene Transportformen, allein für Glycin konnten fünf verschiedene Transportformen gezeigt werden (Ellory et al., 1981).

Zudem finden sich weitere Transporter in der Erythrozytenmembran wie Laktat (Deuticke et al., 1982). Es zeigte sich, dass Retikulozyten sowie junge Erythrozyten eine erhöhte Transportaktivität gegenüber älteren Erythrozyten aufweisen (Hall and Ellory, 1986; Kirk et al., 1992).

Falls Parasiten eine erhöhte Neigung zu jungen als zu älteren Erythrozyten zeigen, sollten diese auch eine erhöhte Transportaktivität aufzeigen können. Einige Stämme wie beispielsweise *Plasmodium vivax* zeigen eine starke Neigung zu Retikulozyten, wohingegen *Plasmodium falciparum* eine 2- bis 3-fach niedrigere Neigung zu Retikulozyten als zu älteren Erythrozyten aufweist (Mons, 1990). Letztlich ist nicht bekannt, ob eine hohe Affinität von *Plasmodium falciparum* zu bestimmten Stadien der Erythrozyten besteht.

Aus einigen Merozoiten können Gametozyten als sexuelle Form entstehen, die bei einem weiteren Mückenstich durch den Speichel der Anopheles-Mücke aufgenommen werden können. In ihrem Darm kommt es anschließend zur Befruchtung und es entsteht eine Zygote. Über weitere Teilungsschritte entstehen neue Sporozoiten. Diese wiederum gelangen in den Speichel und der Infektionszyklus kann von Neuen beginnen (Estler, 2006; Mutschler, 2013).

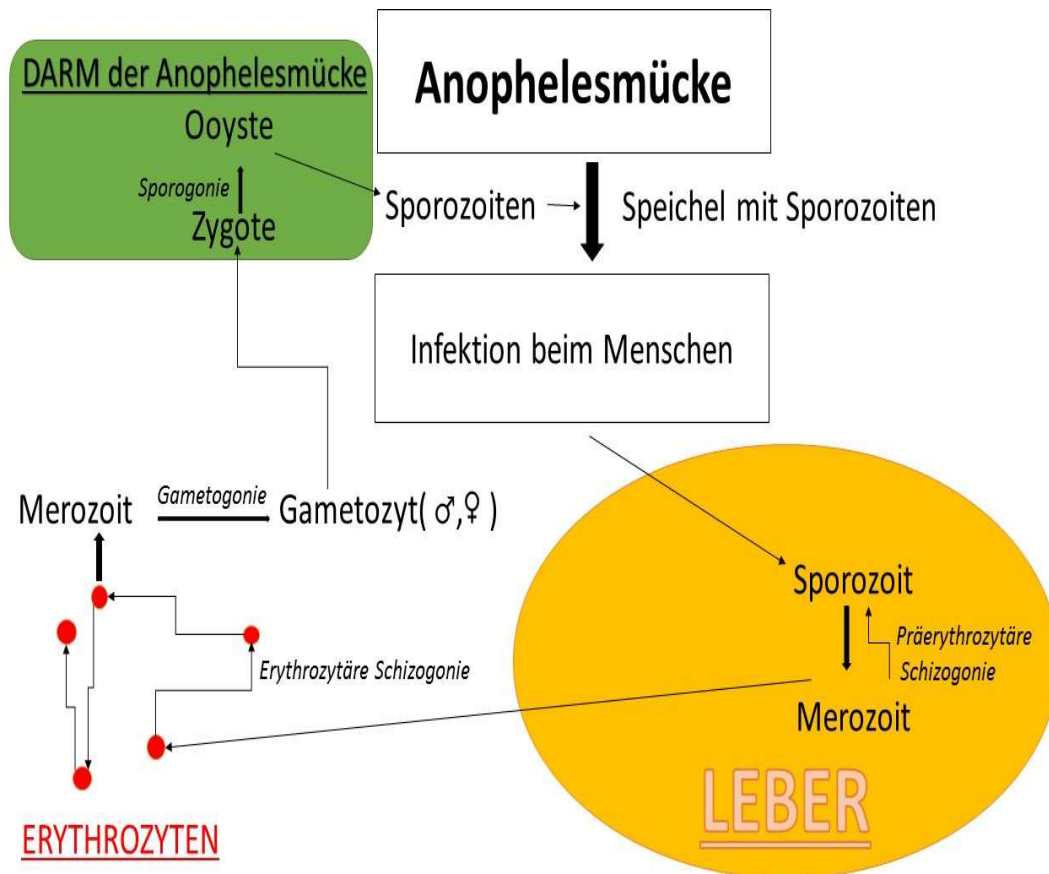


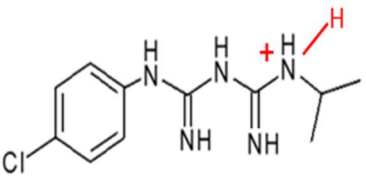
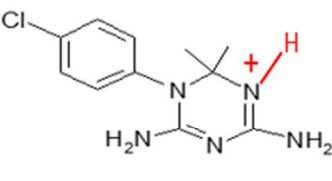
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Pathogenese der Malariaerkrankung

Proguanil wurde zu dieser Zeit nach einer großen Suche zwischen einigen Molekülen mit einer Biguanid-Struktur, welches gegen den Erreger *Plasmodium falciparum* wirken sollte, entdeckt (Curd et al., 1945). Bewiesen wurde auch die Effizienz sowie die gute Verträglichkeit am Menschen (Maegraith et al., 1945). Ab diesem Zeitpunkt wurde Proguanil zur Prophylaxe gegen Malaria eingesetzt. Carrington und Kollegen (Carrington et al., 1951) fanden heraus, dass Proguanil sich zu seinem aktiven Metaboliten Cycloguanil bildet, der eine starke Wirkung gegenüber dem Erreger zeigt. Aufgrund weiterer Forschungen sowie der strukturellen Ähnlichkeit von Cycloguanil zu Pyrimethamin wurde ein Zusammenhang zur Hemmung des plasmodialen Enzyms Dihydrofolatreduktase des Erregers gebildet. Die Dihydrofolatreduktase hydriert die Folsäure in Dihydro- sowie Tetrahydrofolsäure. Die Folsäure ist essentiell für die Biosynthese der Nukleotide. Eine

Hemmung des Enzyms führt zum Stopp der weiteren Vermehrung des Erregers. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in Regionen, in denen Resistenzen gegenüber Pyrimethamin bereits sichtbar wurden, Proguanil sowie Cycloguanil ihre prophylaktische Wirkung beibehalten hatten (Colbourne and Draper, 1983). Somit stieg erneut die Beachtung dieser Arzneistoffe.

1.5.3 Chemische Struktur von Proguanil und Cycloguanil

Tabelle 1-2: Pharmako-chemische Daten von Proguanil und Cycloguanil

	Proguanil	Cycloguanil
Struktur		
Log D _{7,4}	- 0,62	-0,06
pks	10,2	9,2
Protonierter Anteil bei physiologischem pH-Wert	99,9	99,8

1.5.4 Metabolismus

Proguanil wird aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und ist ein Prodrug, das zu ca. 30% in der Leber über CYP2C19 zu Cycloguanil sowie zu ca. 10 % zu p-Chlorophenylbiguanid oxidiert wird. Proguanil selbst hat nur eine schwache antiparasitäre Wirkung. Durch die Metabolisierung über CYP2C19 ergeben sich für den Arzneistoff unterschiedliche

genetisch bedingte Geschwindigkeiten der Biotransformation. Vermutet wird ein unzureichender Schutz gegen Malaria bei langsamen Metabolisierern (Mutschler, 2013). Der aktive Metabolit Cycloguanil führt zu der entsprechenden Wirkung auf die Dihydrofolatreduktase der Parasiten. Dieser besitzt eine deutlich stärkere Wirksamkeit gegenüber präerythrozytären, intrahepatischen Formen von *Plasmodium falciparum*. Auf die menschliche Dihydrofolatreduktase hat es eine deutlich geringere Auswirkung. Etwa 60% des Arzneistoffs Proguanil werden unverändert über die Nieren eliminiert (Estler, 2006; Mutschler, 2013).

1.5.5 Indikation, Kontraindikation, Neben- und Wechselwirkungen

Indiziert ist Proguanil in Kombination mit dem Arzneistoff Atovaquone (Malarone®) zur Prophylaxe bis zu einem Tag vor der Einreise und eine Woche nach der Ausreise, jedoch maximal 28 Tage. Durch die Resistenzentwicklung in vielen Ländern sowie gastrointestinaler Beschwerden ist die Gabe von Proguanil (Paludrine®) zusammen mit Chloroquin (Resochin®) nicht sinnvoll. Chloroquin wird zur Malariaphylaxe sowie als Notfalltherapeutikum bei allen humanpathogenen Erregern verabreicht. Jedoch sind weit verbreitete Chloroquin-resistente Stämme vorhanden. Es treten gelegentlich gastrointestinale Beschwerden, Stomatitis, Haarausfall sowie eine Leukopenie auf. Kontraindiziert ist Proguanil bei schweren Nierenfunktionsstörungen. Die Resorption aus dem Darm kann durch die Einnahme von magnesiumhaltigen Antazida beeinträchtigt sein, daher sollte dazu drei Stunden Abstand gehalten werden (Estler, 2006; Mutschler, 2013).

1.6 Amisulprid, Tiaprid, Sultopirid und Sulprid

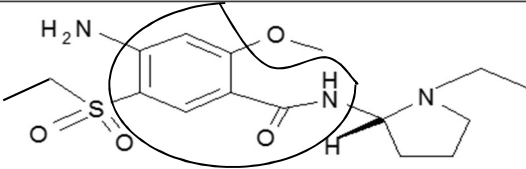
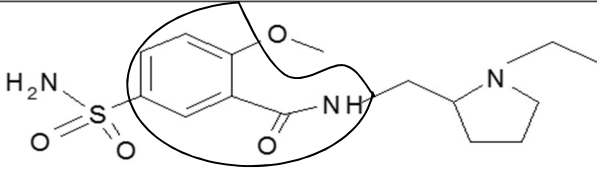
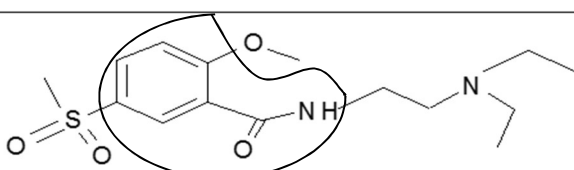
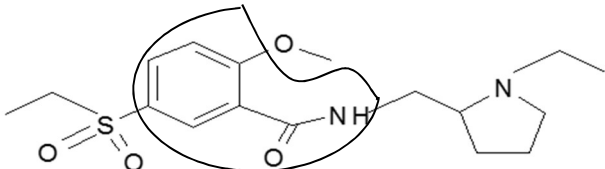
1.6.1 Medizinischer Hintergrund

Psychopharmaka werden unterteilt in Neuroleptika, Antidepressiva, Tranquilantien, Psychostimulantien sowie Psychomimetika. Seit ihrer Einführung in den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts konnten deutliche Fortschritte bei Patienten mit psychischen Beschwerden erzielt werden. Bekannt ist, dass bei vielen psychischen Erkrankungen eine

Störung der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin vorliegt, deren gestörtes Gleichgewicht durch den Einsatz von Psychopharmaka beseitigt werden kann (Mutschler, 2013).

Schizophrenie ist eine chronische psychische Erkrankung, die den Patienten in seiner Lebensgestaltung und Lebensqualität einschränkt. Ungefähr ein Prozent der Bevölkerung, unabhängig von der kulturellen Herkunft und Abstammung, erkranken an Schizophrenie (Kotan et al., 2011). Die Ursache und Zusammenhänge bei der Schizophrenie sind noch nicht vollständig verstanden. Für die Arzneimitteltherapie und für die vorliegende Arbeit ist die Erkenntnis wichtig, dass Schizophrenie neurochemisch mit einer inadäquat starken dopaminergen und/oder serotoninen Neurotransmission in einigen Hirnbereichen zusammenhängt. Auch wird eine Änderung der GABAergen, glutamatergen und cholinergen Erregungsübertragung diskutiert (Mutschler, 2013). Dies erklärt sich dadurch, dass man mit dopaminerg oder serotoninerg wirkenden Substanzen Symptome der Schizophrenie auslösen kann. Nach einer genauen Diagnose und Bestimmung der Erkrankung ist eine Behandlung mit antipsychotischen Medikamenten notwendig, da andere Verfahren wie eine Psychotherapie bei dieser Erkrankung keine ausreichende Wirksamkeit zeigen (Mortimer, 2003). Neuroleptika werden unterteilt in „typische“ und „atypische“ Neuroleptika. Durch die Einführung der Arzneistoffe wie Amisulprid und Sulpirid, welche auch als „atypische“ Neuroleptika bezeichnet werden, kam man der Behandlung der Schizophrenie sowohl in Bezug auf das Wirkspektrum als auch der verbesserten Verträglichkeit ein großes Stück näher. Neuroleptika (Ausnahme von Sulpirid) wirken sedierend, vegetativ dämpfend sowie antipsychotisch (Mutschler, 2013). Amisulprid (Solian®), Sulpirid (Dogmatil®), sind Arzneistoffe, die der Gruppe der atypischen Neuroleptika zugeordnet werden. Ein großer Teil der vorhandenen Arzneistoffe dieser Gruppe besitzt eine hohe Affinität sowohl zu Dopamin- als auch Serotonin-Rezeptoren (Burns and Bale, 2001; Moller, 2000). Die chemische Struktur der in der **Tabelle 1-3** aufgeführten Neuroleptika hat die Benzamidstruktur (eingekreist) als Gemeinsamkeit.

Tabelle 1-3: Chemische Struktur der hier untersuchten Neuroleptika mit Benamidstruktur

Arzneistoff	Chemische Struktur
Amisulprid	
Sulpirid	
Sultoprid	
Tiaprid	

Sulpirid wirkt überwiegend als selektiver D₂-Rezeptor-Antagonist. Es wirkt sowohl neuroleptisch als auch antidepressiv, stimmungsaufhellend und antriebssteigernd, jedoch nicht sedierend. Amisulprid ist eine Analogsubstanz zu Sulpirid. Amisulprid stellt einen selektiven Antagonisten des Dopamin-Rezeptors dar, der eine hohe Affinität zu D₂- und D₃-Rezeptoren besitzt (Xiberas et al., 2001). Beide Arzneistoffe sind nur schwer hirngängig. Tiaprid (Tiapridex®) ist ein D₂-Rezeptor-Antagonist. Es wird bei „*Neuroleptika-induzierten Spätdyskinesen* sowie *choreatrischen Bewegungsstörungen*“ (Mutschler, 2013) angewandt.

Sultoprid (Topral®) ist ein Arzneistoff, welcher zu der Familie der atypischen Neuroleptika zählt. Er ist ein selektiver D₂- und D₃-Antagonist und wird bei der Erkrankung der Schizophrenie angewandt. In Europa wird durch das Vorhandensein von Amisulprid und weiteren Arzneistoffen aus derselben Gruppe auf Sultoprid selten zurückgegriffen.

1.6.2 Metabolismus

Amisulprid und Sulpirid werden bei oraler Gabe nur unvollständig resorbiert. Die Bioverfügbarkeit bei Amisulprid ist zwar höher als bei Sulpirid (45-50% gegenüber 20-35%), aber im Vergleich zu anderen atypischen Neuroleptika wie Aripiprazol (85%) oder Risperidon (80-65%) deutlich niedriger. Die Plasmahalbwertszeit für Amisulprid liegt bei 12-17 Stunden, für Sulpirid zwischen 6-8 Stunden. Hohe Gewebskonzentrationen finden sich in der Niere, der Lunge und der Leber. Beide Arzneistoffe werden bis nahezu 90-95% unverändert über die Niere ausgeschieden (Estler, 2006; Mutschler, 2013). Es ist bisher nicht bekannt, wie Amisulprid und Sulpirid die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Beide Arzneistoffe zeigen eine niedrige Membranpermeabilität (Dos Santos Pereira et al., 2014).

1.6.3 Indikation, Kontraindikation, Neben- und Wechselwirkungen

Amisulprid wird je nach Krankheitsgrad unterschiedlich dosiert. In niedrigen Dosen blockiert Amisulprid bevorzugt präsynaptische dopaminerge Autorezeptoren, sodass es zu einer Verstärkung der Dopaminübertragung kommt. Dies kann darauf hindeuten, dass Amisulprid eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber herkömmlichen Antipsychotika und des Placeboeinsatzes besitzt (Leucht et al., 2002; Schoemaker et al., 1997). Laut einer Meta-Analyse von 2009 zeigt Amisulprid eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber herkömmlichen Antipsychotika (Leucht et al., 2009).

Hinweise lassen die Annahme zu, dass bestimmte Antipsychotika ein erhöhtes Risiko für Insulinresistenz, Hyperglykämie, Diabetes mellitus Typ 2, Fettstoffwechselstörung sowie einer wesentlichen Gewichtszunahme bergen (Allison et al., 1999; Fleischhacker et al., 2008; Newcomer, 2005). Die Behandlung mit Amisulprid führt je nach Dauer zu einer Gewichtszunahme von 0,2 KG und 1,4 KG (Russell and Mackell, 2001; Tschoner et al., 2007).

Die Dosierung von Amisulprid beträgt zu Beginn 400-800 mg/Tag bei Patienten mit Positiv- und Negativsymptomatik, es kann je nach erhöhter Positivproblematik auf 1200

mg/Tag erhöht werden. Die Einnahme erfolgt zweimal täglich. Bei einer primären Negativsymptomatik beträgt die Dosierung 100-300 mg/Tag. Häufig (1-10%) treten unter der Therapie mit Amisulprid Erregungszustände, Schlafstörungen, Hypotension und Mundtrockenheit auf. Des Weiteren treten sexuelle Unlust sowie ein erhöhter Prolaktinspiegel auf, was auf dessen stärkere Wirkung auf die Hypophyse zurückzuführen ist, da sich diese außerhalb der Blut-Hirn-Schranke befindet. Auch seine antiemetische Wirkung ist deutlich ausgeprägt, da die Triggerzone der Area postrema ebenfalls außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegt. Weitere Nebenwirkungen sind Amenorrhö und Galaktorrhö (Estler, 2006; Mutschler, 2013). Kontraindiziert ist es bei prolaktinabhängigen Tumoren sowie Niereninsuffizienz und ausgeprägten Hirnschäden. Aluminiumhaltige Antazida und Sucralfat reduzieren die Resorption von Sulpirid. Die gleichzeitige Gabe von Amisulprid mit Levodopa (Antiepileptikum), ein Prodrug, das als Vorstufe für die Biosynthese von unter anderem Dopamin dient oder Piribedil (Parkinsontherapeutikum), welches ein Dopaminagonist ist, sollte vermieden werden, da es die psychotischen Beschwerden auslösen oder verstärken kann. Des Weiteren sollten Wirkstoffe wie Amiodaron, Chinidin oder Citalopram, welche die Erregungsleitung am Herzen beeinflussen und dadurch das Risiko des Hervorrufens von Herzrhythmusstörungen erhöhen können, nicht gleichzeitig eingenommen werden.

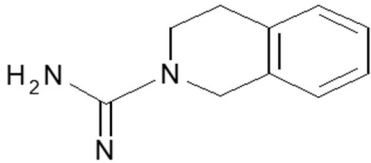
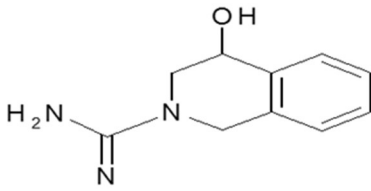
1.7 **Debrisoquin und 4-Hydroxydebrisoquin**

1.7.1 **Medizinischer Hintergrund**

Debrisoquin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Antihypertensiva. Es wird zur Therapie des Bluthochdrucks seit Jahrzehnten nicht mehr angewandt. Anhand von Debrisoquin wurde das Enzym CYP2D6 entdeckt.

1.7.2 Chemische Struktur

Tabelle 1-4: Chemische Struktur von Debrisoquin und 4-Hydroxydebrisoquin

Arzneistoff	Chemische Struktur
Debrisoquin	
4-Hydroxydebrisoquin	

Die Berechnungen des Anteils der Struktur der protonierten Form von 99,997% (**Abbildung 1-8**) und des pks-Wertes von 11,97 von Debrisoquin wurden mit der ADMET Predictor Software Simulations Plus (Lancaster, USA) bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 ermittelt.

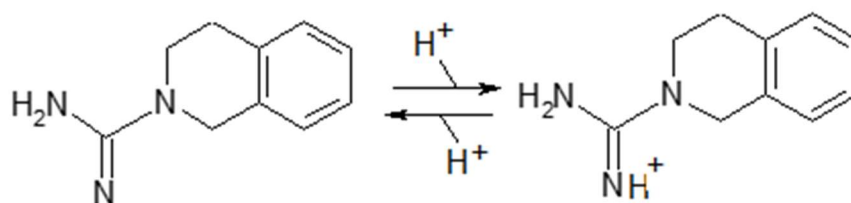


Abbildung 1-7: Darstellung der protonierten und unprotonierten Form von Debrisoquin

1.7.3 Metabolismus

Debrisoquin wird durch die oxidative Metabolisierung (Hydroxylierung) unter CYP2D6 zu 4-Hydroxydebrisoquin metabolisiert und über den Urin ausgeschieden (Cerqueira et al., 2000; Gonzalez et al., 1988; Malcolm and Marten, 1976; Medina et al., 1969). Es hat sich gezeigt, dass die extreme Variabilität in der Metabolisierung von Debrisoquin erblich ist und sich in Form von zwei extremen Phenotypen äußert. Dabei handelt es sich um die Extensiv-Metabolisierer (EM) und die Langsam-Metabolisierer (PM), wobei die Langsam-Metabolisierer etwa zehn Prozent der Bevölkerung ausmachen (Mahgoub et al., 1977). Ein genetischer Defekt ist für die verlangsamte beziehungsweise fast vollständig fehlende Hydroxylierung von Debrisoquin zu 4-Hydroxydebrisoquin verantwortlich. Die Hydroxylierung erfolgt an der Position 4. Die Ausscheidung findet mit zunehmender Polarität über die Hydroxylierung und anschließender Glukuronidierung über die Niere statt (**Abbildung 1-9**).

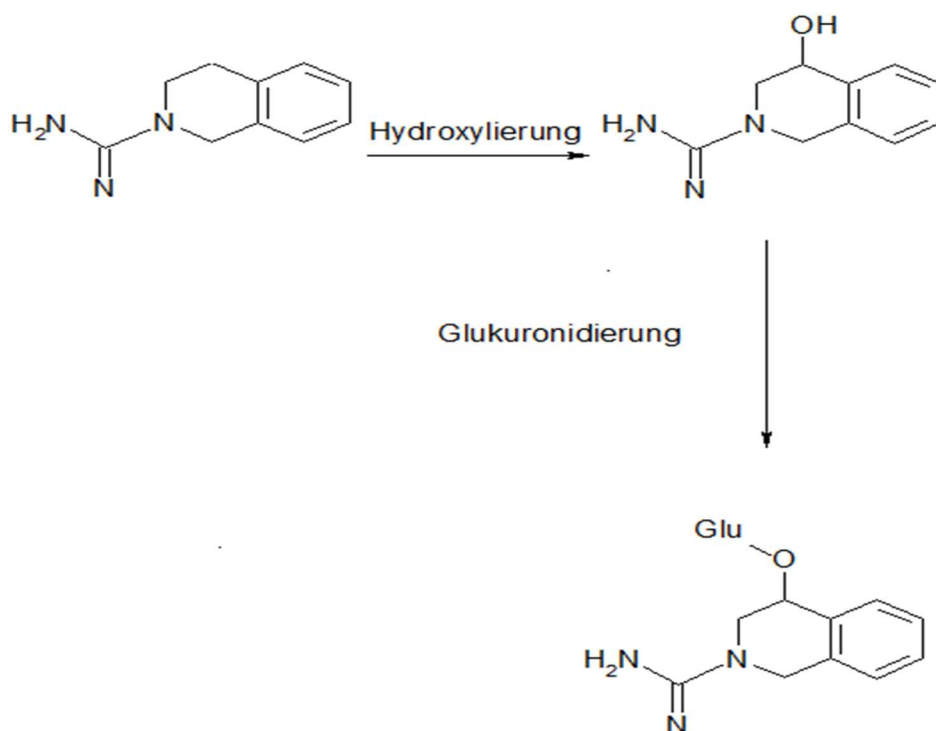


Abbildung 1-8: Metabolisierung von Debrisoquin zu 4-Hydroxydebrisoquin und anschließender Glukuronidierung.

1.8 Ziele und Zusammenfassung

Die Bedeutung genetischer Variation bei der Biotransformation von Arzneimitteln ist gut bekannt. Es hat sich in den letzten zwei Dekaden gezeigt, dass in den Genen einiger Arzneimittel-Membrantransporter eine erhebliche erbliche Variation besteht. Aus diesem Grunde und wegen der Bedeutung bei Arzneimittel-Interaktionen ist die Erforschung der relevanten Membrantransporter inzwischen zu einem wichtigen Bestandteil der präklinischen und frühen klinischen Arzneimittelentwicklung geworden. Für hydrophobe Arzneistoffe sind Efflux-Transporter wie der *Multidrug-Resistance-Proteine 1* (MDR1) von großer Bedeutung. Hinzu kommen für die hydrophilen Arzneistoffe viele Influx-Transporterproteine wie beispielsweise die organischen Kationentransporter (OCTs), die die Aufnahme von organischen kationischen Molekülen in die Zelle beschleunigen.

Um bei Transportmessungen Konzentration innerhalb der Zelle zu messen, ist heute neben der immer noch weit verbreiteten Anwendung der radioaktiven Markierungen die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) das am häufigsten verwendete analytische Verfahren. Jedoch lässt sich nicht jede bereits publizierte Methode problemlos auf die vorhandenen Gegebenheiten und Anforderungen bezüglich der Empfindlichkeit übertragen. Daraus ergaben sich die speziellen Herausforderungen der vorliegenden Arbeit.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Ziele verfolgt: Für Untersuchungen zur Bedeutung organischer Kationentransporter sollte zunächst die Optimierung und Validierung von HPLC-Methoden zur quantitativen Bestimmung der Arzneistoffe Proguanil, Cycloguanil, Amisulprid, Debrisoquin und 4-Hydroxydebrisoquin erfolgen. Die Biochemie der zellulären Aufnahme von Proguanil sowie Cycloguanil sollte geklärt werden. Dies sollte erfolgen anhand von HEK293-Zellen, welche die vermutlich hier relevanten organische Kationentransporter OCT1-3 sowie OCTN1 und OCTN2 exprimierten. Zur weiteren Klärung und Bestätigung sollten auch Experimente mit Inhibition des Transports an den oben erwähnten OCTs durchgeführt werden. Ferner sollten zu Proguanil und Cycloguanil die Auswirkungen der bei Europäern relevanten und natürlicherweise auftretenden Genvarianten und Interaktionen mit weiteren Arzneistoffen auf den

Membrantransport analysiert werden. Schließlich sollte der Transport von Proguanil durch Erythrozytenmembranen mit anschließender Inhibition des vermeintlichen Transports und der Interaktion mit weiteren Arzneistoffen analysiert werden. Durch die Validierung und Optimierung der HPLC-Methoden konnten die Konzentrationen der Arzneistoffe Proguanil, Cycloguanil, Amisulprid sowie Debrisoquin quantitativ bestimmt werden. Die obigen Arzneistoffe konnten mit der erforderlichen Empfindlichkeit und Präzision gemessen werden

Die In-Vitro-Versuche zeigten, dass das Antimalariamittel Proguanil und sein aktiver Metabolit Cycloguanil über die elektrogenen organischen Kationentransporter OCT1, OCT2 und OCT3 mit unterschiedlicher V_{max} und K_M transportiert werden können. Die organischen Kationentransporter OCTN1 und OCTN2 zeigten hingegen keine Beschleunigung der zellulären Aufnahme der beiden Substanzen.

Ausgewählte Polymorphismen des OCT1, die mit einer erhöhten Häufigkeit bei Kaukasiern auftreten und Auswirkungen auf die Aufnahme von anderen Arzneistoffen zeigten, zeigten auch bei Proguanil und Cycloguanil einen veränderten und in der Regel reduzierten Membrantransport. Die gleichzeitige Gabe weiterer Pharmaka (insbesondere Mefloquin, Chinin oder Omeprazol mit unterschiedlichen Konzentrationen) führten zu einer Reduktion des Membrantransports von Proguanil und Cycloguanil an OCT1.

Der erythrozytäre Transport des Antimalariamittels Proguanil durch die Erythrozytenmembran konnte ebenfalls analysiert werden. Dieser war unter anderem mit L-Carnitin hemmbar und folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Ergebnisse zeigen, dass die organischen Kationentransporter eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme und Ausscheidung von Proguanil und Cycloguanil im menschlichen Organismus spielen können.

1.9 **Aims and summary of this work**

The importance of genomic variation in the biotransformation of drugs is well known. Only in the last two decades, the big importance of drug membrane transporters and of genomic variation in their genes became apparent. For this reason and because of the importance in drug-drug interactions, the identification of the relevant membrane transporters has meanwhile become an essential part of pre-clinical and early clinical drug development. Particularly for hydrophobic drugs the ATP consuming efflux transporters like the multidrug resistance transporter 1 (MDR1) are highly important. In addition to the efflux transporters, there are influx transport proteins which accelerate the uptake of hydrophilic cationic molecules into the cell. One group of these influx transporters are the organic cation transporters (OCTs). In order to measure substrate concentrations in transport experiments within the cell, the analytical method of the high pressure liquid chromatography (HPLC) is the most commonly used procedure alongside to the still widespread use of radioactive labels. However, not every previously published method can be easily transferred to the existing conditions. The specific challenges of this present work resulted from the small volumes and low concentrations to be analyzed in the transport experiments.

The thesis had the following objectives:

Firstly, the HPLC methods for quantitative analysis of drugs such as proguanil, cycloguanil, amisulpride and debrisoquine for membrane transport experiments should be optimized and validated. The cellular uptake of proguanil and cycloguanil should be measured in HEK293 cells which overexpress the organic cation transporters OCT1, -2, and -3 and OCTN1 and -N2. The data should be further validated by inhibition of the transport using typical inhibitors of OCTs and drugs relevant as comedication. In addition, the impact on the relevant inherited variants of organic cation transporters should be analyzed. Finally, the transport of proguanil into non-infected erythrocytes should be characterized. This should include inhibition experiments with prototypical inhibitors of organic cation transporters and with substances relevant as co-medication.

Based on validation and optimization of HPLC methods, the concentration of the drugs proguanil, cycloguanil, amisulpride and debrisoquine could be determined quantitatively. The drugs were measured and detected in the low nanogram/ml concentration range.

In-vitro experiments showed that the antimalarial drug proguanil and its active metabolite cycloguanil can be transported with different maximum transport velocities and affinities by the electrogenic organic cation transporters OCT1, OCT2 and OCT3. In contrast to them, the organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 overexpressed in HEK cells didn't show any increase in the cellular uptake of proguanil and cycloguanil.

Selected inherited variants of OCT1 existing in Caucasian populations with a relatively high frequency and differing in their transport functions with many other drug also showed altered uptake of the drug proguanil and its active metabolite cycloguanil here. Coincubation with other drugs or model substrates in different concentrations showed significant reductions in the transport of proguanil and cycloguanil by OCT1. In particular, transport activity was reduced by quinine, mefloquine and omeprazole.

A carrier-mediated transport of the antimalarial drug proguanil through the erythrocyte membrane could also be shown. This process could be inhibited and followed a Michaelis-Menten kinetics. Interestingly, the erythrocyte uptake could be inhibited by the OCTN substrate carnitine, a finding which requires further studies considering that overexpression of OCTN1 and OCTN2 in HEK cells did not increase proguanil or cycloguanil uptake. In conclusion, the results showed that the organic cation transporters OCT1, OCT2 and OCT3 may play a role in the absorption and secretion of proguanil and cycloguanil within the human organism.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
4-Hydroxydebrisoquin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Amisulprid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BCA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bicinchoninsäure-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
l-Carnitinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chininhydrochloriddihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cycloguanilhydrochlorid	Santa Cruz Biotechnology
Debrisoquin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Doxycyclinhyclat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure 100%, pro analysis	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt 99%	Chemie Vertrieb Hannover
Fetales Kalbsserum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Hydroxychloroquinsulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kupfersulfatpentahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mefloquinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Metforminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol für HPLC	Merck, Darmstadt
Metoclopramidhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Reagenzien	Hersteller
Metoprololtartrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
1-Methyl-4phenylpyridinium-iodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	BioRad, Hercules, USA
Omeprazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ondansetron- hydrochloriddihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin- Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Polylysin-D-hydrobromide	Invitrogen, Karlsruhe
Proguanilhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rabeprazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS- Pulver (Dulbecco's 10-fach)	AppliChem, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sulpirid	Santa Cruz Biotechnology
Sultopridhydrochlorid	Santa Cruz Biotechnology
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure 31%	Merck, Darmstadt
Tiapridhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau-Lösung (4%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Venlafaxinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
50ml Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München
96 Well Platte	Sartstedt
Evolute WCX30 96well Platte	Biotage, Uppsala
Kulturflaschen 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
LiChrosorb S60 Säule	Merck, Darmstadt
Lichrospher C18e Säule	Merck, Darmstadt
Lichrospher CN 100 Säule	Merck, Darmstadt
LichrospherCN5µMVorsäule	Merck, Darmstadt
PAMPA-Platten	CORNING, Bedford, USA
Parafilm	Brandt, Wertheim
Petri-Schalen für Zellkultur, Falcon 353003	Schütt, Göttingen
Petri-Schalen für Zellkultur, Falcon 353025	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen [10µl,100µl,1000µl]	Sarstedt, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Sarstedt, Hamburg
Sterile Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Hamburg
Zellschaber	Sarstedt, Hamburg

2.3 **Geräte**

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5810 R	Sarstedt, Hamburg
CO2-Inkubator BBD 6220	Hereaus, Hanau
Evaporator Dri Block 3A	Techne, Staffordshire, UK
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Hitachi-Merck-HPLC-System	Merck, Darmstadt
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKAMAG, Staufen
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
Neubauer improved Zählkammer	Schütt, Göttingen
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Tecan Ultra	Männedorf, Schweiz
Zentrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München

2.4 Software und Datenbank

Software	Hersteller
ADMET Predictor	Simulations Plus, Lancaster, USA
Endnote X7	Wintertree Software Inc.
DocCheck Fachinformation	DocCheck Medical Services GmbH, Köln
HPLC-System Manager D7000	Merck, Darmstadt
MathType 6	Design Science Inc, Long Beach, USA
MDL ISIS DRAW 2.5	MDL Information Systems Inc, Hayward, USA
MS Office 2013	Microsoft, USA
Rote Liste	Rote Liste GmbH, Frankfurt am Main
Sigma Plot 12	Systath, Erkrath
X Flour4 Software	Tecan, Crailsheim

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HEK-OCT1	Institut Klinische Pharmakologie (generiert durch Ali Reza Saadatmand), Universitätsmedizin Göttingen
HEK-OCT2	Institut Klinische Pharmakologie (generiert durch Manar Abu Abed), Universitätsmedizin Göttingen
HEK-OCT3	Prof. Koepsell, Dr. Gorboulev, Justus-Maximilians-Universität Würzburg
HEK-OCTN1	Institut Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen
HEK-OCTN2	Institut Klinische Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen
Erythrozyten	Blutbank, Universitätsmedizin Göttingen

Verwendete Arzneistoffe, die in der Arbeit zum Einsatz gekommen sind, liegen in der folgenden Tabelle 5 vor.

Tabelle 2-1: Weitere Verwendete Arzneistoffe

Name	Handels-namen	Wirkstoffklasse	Pharmakologische Wirkung
Carnitin	L-Carnitin	Chemische Verbindung	Transport von langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran
Chinin	Limptar N®	Muskelrelaxans, Antimalariamittel	Hemmung der Bildung der Hämpolymerase der Erreger, somit kommt es zum Absterben des Erregers in den Erythrozyten
Chloroquin	Resochin®	Antiprotozoika, Antirheumatika	Hemmung der Kristallisation von Hämозoin. Zusätzlich findet es Einsatz bei der rheumatoiden Arthritis sowie bei Lupus erythematoses
Doxycyclin	Doxymono®	Antibiotika	Hemmung der Proteinbiosynthese durch reversible Blockade der Aminoacyl-t-RNS an die 30S-Untereinheit, es kommt zum Stopp der Elongation der Peptidkette
Hydroxychloroquin	Quensyl®	Antiprotozoika	Der Wirkstoff ist abgeleitet von Chloroquin. Es besitzt die selbe pharmakologische Wirkung wie Chloroquin
Mefloquin	Lariam®	Antiprotozoika	Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt.
Metformin	Siofor®	Antidiabetika	Hemmung der Glucose-Neubildung in der Leber,
Metoprolol	Beloc®	Antihypertensiva	Hemmung der β -Adrenorezeptoren, vorwiegend β_1 am Herzen, somit führt es zur Senkung der Schlagfrequenz, der Kontraktilität sowie Erregungsleitungsgeschwindigkeit des Herzes.
Naringin	Naringin	Glycosid des Naringenin	Bitterstoff in Zitrusfrüchten, hemmt Subtypen des CYP 450

Name	Handels-namen	Wirkstoffklasse	Pharmakologische Wirkung
Omeprazol	Omepr®	Protonenpumpenblocker	Hemmung der H^+-K^+ -ATPase und somit verminderte Protonenfreisetzung und Anstieg des pH-Wertes des Magensafts
Ondansetron	Zofran®	Antiemetikum	Hemmung der Serotoninwirkung an $5HT_3$ -Rezeptoren am viszeralen efferenten Vagus sowie im Brechzentrum des ZNS
Pyrimethamin	Daraprim®	Antiprotozoika	Hemmung der Dihydrofolatreduktase der Protozoen
Rabeprazol	Pariet®	Protonenpumpenblocker	Hemmung der H^+-K^+ -ATPase und somit verminderte Protonenfreisetzung und Anstieg des pH-Wertes des Magensafts
Venlafaxin	Trevilor®	Antidepressivum	Es vermindert die Rückaufnahme von Serotonin und Noradrenalin die präsynaptischen Vesikeln an bestimmten Synapsen im Gehirn
Verapamil	Vera-Lich®	Calciumantagonist	Einsatz bei chronisch stabiler Angina pectoris, als Antiarrhythmikum bei Herzrhythmusstörungen

2.6 Methoden

2.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine der bedeutenden Methoden in der pharmazeutischen Analytik ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, bei der Substanzen unterschiedlichster Art untersucht und identifiziert werden können. Sowohl Peptide, Kohlenhydrate, Hormone als auch Arzneistoffe können durch verschiedenste Trennverfahren voneinander selektiert und detektiert werden. Entwickelt wurde die HPLC aus der Säulenchromatographie (Lindsay, 2000), bei der die Säule mit dem Trennmittel zu Beginn per Hand gefüllt wurde. Eine effektive Chromatographie benötigt ein Trennmittel (stationäre Phase) kleinster Partikelgröße sowie leistungsstarke Pumpen, die das Elutionsmittel (mobile Phase) mit hohem Druck konstant befördern können. Die mobile Phase treibt dabei die Probe in gelöster Form über die stationäre Phase. Wechselwirkungen führen schließlich zur Auftrennung des Probengemisches in seine einzelnen Bestandteile. Alle theoretischen Grundlagen der

HPLC, welche in den folgenden Untertiteln erläutert werden, stammen aus der Literatur (Bauer, 1999; Kromidas, 2011; Meyer, 2009; Rücker, 2001) sowie unseren festgelegten Spezifikationen.

2.6.2 Konzentrationsbestimmungen mittels HPLC

2.6.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Chromatographie ist ein physikalisch-chemischer Trennprozess, bei dem die zu trennenden Substanzen in Form eines Probengemischs zwischen zwei Phasen verteilt werden. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist die meist angewandte Form der chromatographischen Trennung in der pharmazeutischen Analytik. Ein Vorteil bsp.-weise gegenüber der Gaschromatographie liegt darin, dass die Substanzen nicht verdampft werden müssen. Sie können im gelösten flüssigen Zustand untersucht werden. Die Methode hat eine hohe Flexibilität, denn für wohl jede Problemstellung in der Analyse der Substanzen kann ein selektives Trennsystem durch eine veränderte Zusammensetzung der stationären und mobilen Phase erreicht werden. Dabei trägt eine Phase (mobile Phase) das Probengemisch in Fließrichtung über die zweite Phase (stationäre Phase), die ruht. Die stationäre Phase besteht aus festen Teilchen (Festkörper) in einem Rohr (Säule). Die mobile Phase ist eine Flüssigkeit, welche kontinuierlich auf die stationäre Phase gegeben wird, bis der chromatographische Trennprozess beendet ist. Anschließend lassen sich die Substanzen qualitativ und quantitativ anhand eines Detektors und in Form eines Peaks bestimmen.

Treten keine Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und der Substanz auf, wird die Substanz zügig mit der mobilen Phase aus der Säule eluiert und detektiert. Dabei zeigt sich die gar nicht an die stationäre Phase gebundene Substanz, dargestellt als Peak, gleich zu Beginn einer chromatographischen Darstellung. Die Zeit, die solch eine Substanz vom Zeitpunkt der Injektion bis zu ihrer Detektion in Anspruch nimmt, wird die Durchflusszeit t_M der Säule genannt.

Substanzen lassen sich aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit der stationären Phase trennen. Die Elution der einzelnen Substanzen wird dadurch verzögert. Daher steht die Nettoretentionszeit t'_R (**Gleichung 2-1**) für die Zeit, die der Analyt in der stationären Phase verbringt. Beschreiben lässt sie sich als Differenz aus der Retentionszeit t_R und der Durchflusszeit t_M .

$$t'_R = t_R - t_M$$

Gleichung 2-1: Berechnung der Nettoretentionszeit

Substanzen besitzen unterschiedliche Nettoretentionszeiten. Diese sind abhängig von der Säulenlänge, dem Säulenmaterial sowie den apparativen Parametern. Der Retentionsfaktor (k) (**Gleichung 2-2**) beschreibt das Verhältnis des Aufenthalts der Substanz in der mobilen und stationären Phase bei der Nutzung eines Trennsystems.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Gleichung 2-2: Berechnung des Retentionsfaktors

Je nach Art des überwiegenden Trennprozesses wird die Chromatographie in Adsorptionschromatographie, Verteilungschromatographie, Ausschlusschromatographie und Austauschchromatographie unterteilt, wobei in der vorliegenden Dissertation auf die Adsorptionschromatographie sowie die Umkehrphasenchromatographie eingegangen wird. Die Adsorptionschromatographie beschreibt die Anlagerung eines Stoffes an einen anderen, ohne eine chemische Verbindung einzugehen. Dabei handelt es sich um eine Anlagerung im Oberflächenraum der stationären Phase. Das Milieu, das für die Adsorption bestehen sollte, wird bestimmt durch:

1. Den Adsorber und dessen Aktivität: Die Kapazität der Adsorption ist von der Größe der Oberfläche des Adsorbers abhängig. Je größer die Oberfläche, desto

mehr Anlagerungsfläche ist vorhanden. Daher ist die Partikelgröße der Teilchen der stationären Phase von großer Bedeutung.

2. Das Lösungsmittel und dessen Eigenabsorption: Lösungsmittel sollten nicht oder nur kaum adsorbiert werden, da sie sonst die aktiven Stellen an der stationären Phase blockieren. Die Ermittlung des geeigneten Lösungsmittels sollte durch Vorversuche bei der Methodenentwicklung vorgenommen werden.
3. Die Löslichkeit der Stoffe in der mobilen Phase: Hierbei sind zwei Kombinationen zwischen stationärer und mobiler Phase zu unterscheiden: Eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase (Normalphasenchromatographie) und umgekehrt (Umkehrphasenchromatographie). Die physikalisch-chemische Grundlage der Normalphasenchromatographie verläuft über permanente und induzierte Dipole. Solche stationären Phasen bestehen vorwiegend aus Kieselgel (SiO_2), Aktivkohle sowie Aluminiumoxid (AlO_2) (**Abbildung 2-1**).

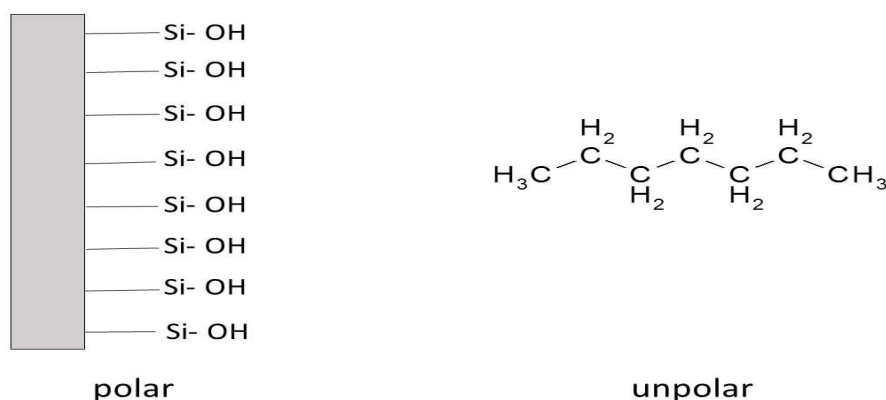


Abbildung 2-1: Stationäre Phase als polare Komponente

Kieselgel(links), Lösungsmittel als unpolare Komponente (rechts)

Die mobile Phase sollte nicht adsorbiert werden, daher ist sie je nach stationärer Phase polar oder unpolar. Mobile Phasen sind beispielsweise Pentan, Toluol, Hexan, Oktan, und

Benzen. Dabei steigen die Wechselwirkungen und das „Festhalten“ der Substanzen nach folgender Reihenfolge mit steigender Polarität:

Alkyle<Halogene<Ester<Alkohole<Carbonsäuren.

Anwendung findet die Normalphasenchromatographie zur Trennung von mittel- bis schwachpolaren Substanzen. Stark polare Substanzen haben eine zu hohe Retention. Die Trennung ist umso besser, je größer die Polaritätsunterschiede sind. Die Umkehrphasenchromatographie, die in der vorliegenden Dissertation Anwendung fand, beschreibt eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase. Dabei besteht die stationäre Phase aus Kieselgel, das mit chemisch gebundenen Alkylsilanen, häufig mit C-18-Alkylketten, modifiziert ist. Der Silanierung wird häufig ein weiterer Herstellungsprozess angefügt. Dies wird als End-capping bezeichnet. Die Silanolgruppen, die nicht mit den Alkylsilanen reagiert haben, werden erneut mit Trimethylchlorsilanen passiviert. Dadurch wird den Gruppen die Polarität genommen. Die Länge der Alkylketten beschreibt die Polarität der stationären Phase. Je länger die Alkylketten, desto unpolarer ist die stationäre Phase (**Abbildung 2-2**).

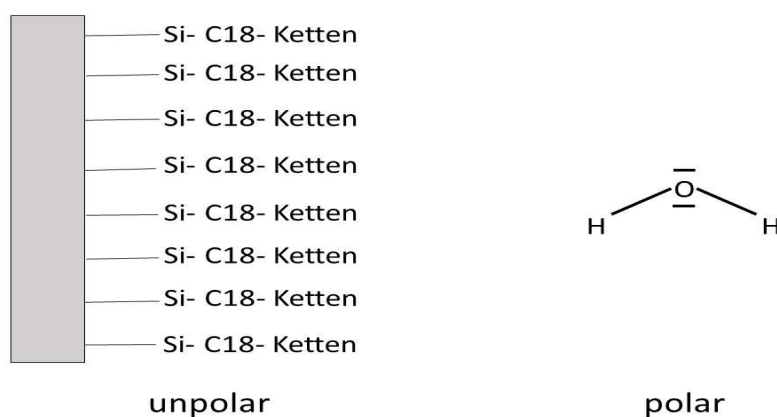


Abbildung 2-2: Stationäre Phase als unpolare Komponente

modifiziertes Kieselgel (links), polarer Eluent (rechts)

Die Einstellung eines Gleichgewichts durch die Verteilung der Moleküle des Proben­gemischs zwischen der stationären und der mobilen Phase führt zur Auftrennung eines Proben­gemischs in seine Bestandteile. Das Gleichgewicht wird durch die kontinuierliche Zu­gabe der mobilen Phase gestört. Dabei bevorzugen einige Teilchen den Aufenthalt in der mobilen, andere hingegen den Aufenthalt in der stationären Phase. Den Verlauf einer chromatographischen Trennung zeigt (**Abbildung 2-3**):

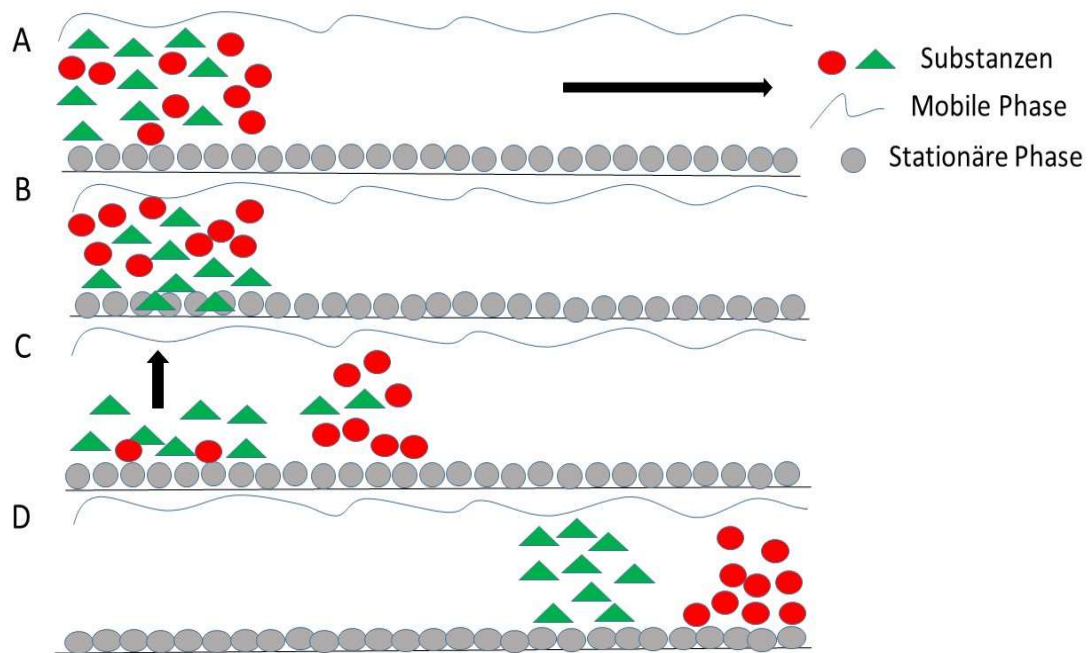


Abbildung 2-3: Einstellung des Gleichgewichts zwischen der mobilen und stationären Phase

Es stellt sich nach obiger Abbildung ein neues Gleichgewicht nach circa 3,5 Körnerdurchmessern der stationären Phase ein. Diese Entfernung stellt eine theoretische Trennstufe, also einen Boden, dar (**Gleichung 2-3**).

$$H = \frac{L}{N}$$

Gleichung 2-3: Berechnung der Trennstufenhöhe H

L = Länge der Säule

N = Bodenzahl N

Je länger die stationäre Phase ist, desto mehr Trennstufen sind vorhanden und somit verbessert sich die Trennung der Bestandteile des Probengemischs. Dies wird durch die Bandenverbreiterung ausgeglichen. Die Darstellung der Analyten in Form eines Peaks vergrößert sich durch die vermehrte Anzahl der Wechselwirkungen durch die größere zurückliegende Strecke bei einer längeren stationären Phase. Daher sollte eine stationäre Phase gewählt werden, die eine hohe Trennstufenzahl, d.h. eine geringe Bandenverbreiterung hat.

Der instrumentelle Aufbau einer HPLC-Anlage wird folgend (**Abbildung 2-4**) schematisch dargestellt.

2.6.2.2 Instrumenteller Aufbau

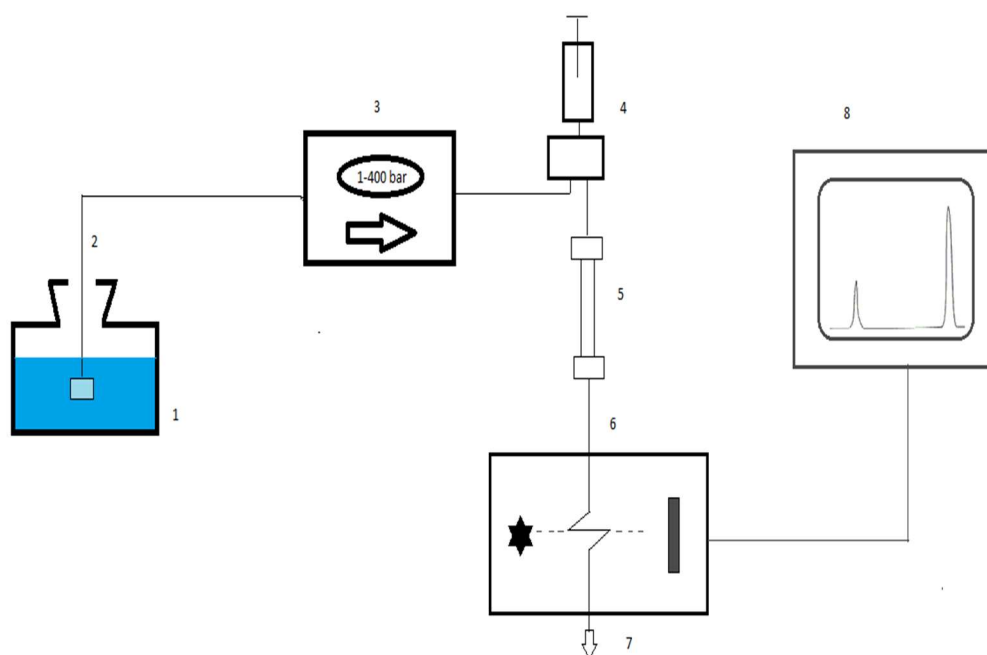


Abbildung 2-4: Instrumenteller Aufbau einer HPLC-Anlage

1. Lösungsmittelvorrat, 2. Zuleitung mit Fritte, 3. Pumpe, 4. Probenaufgabesystem, 5. Säule, 6. Detektor, 7. Abfall, 8. Datenerfassung und -verarbeitung. Das Fließmittel wird aus dem Lösungsmittelvorrat über

eine Kapillare mit Fritte (2) durch die Pumpe (3), der ein binäres oder quartäres Niederdruck-Gradientenmischsystem vorangeschaltet sein kann, und mit Druck über die Trennsäule (5) gespült. Während dieses Prozesses wird über eine Dosierschleife die Probe durch Einspritzung mittels Dosierspritze (4) in das System injiziert. Die Probe wird dadurch mit dem Fließmittel über die Säule getragen und geht Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase ein. Anschließend wird die Probe beim Austritt aus der Säule über einen Detektor (6) bestimmt und durch eine Hard- und Software verarbeitet und als Chromatogramm in Form von Peaks dargestellt.

2.6.2.3 Auswahl der Trennmethode

Bei der Auswahl der Trennmethode werden die Eigenschaften der Probenmoleküle betrachtet. Diese sind in der folgenden **Tabelle 2-2** dargestellt:

Tabelle 2-2: Eigenschaften der Probenmoleküle

Molekülmasse	niedermolekular, hochmolekular
Löslichkeit	hydrophil, hydrophob
Dissoziation	nicht ionisch, ionisch, Kationen, Anionen
Polarität	polar, unpolar, mittelpolar

Bei der Auswahl des Elutionsmittels, also der mobilen Phase, wird eine bessere Trennleistung zur möglichst kompletten chromatographischen Trennung unterschiedlichster Analyten sowie der Abtrennung von allen typischerweise in der Grundmatrix (z.B. Humanserum) existierenden Substanzen angestrebt. Das kann beispielsweise dadurch erreicht werden, indem man das Lösungsmittel durch ein anderes Lösungsmittel mit derselben Polarität ersetzt oder den pH-Wert geringfügig verändert. Die Auswahl eines Detektors hängt mit der chemischen Struktur des zu untersuchenden Moleküls zusammen. In der vorliegenden Dissertation wurde ein Fluoreszenz- sowie ein UV-Detektor verwendet (siehe Kapitel: 2.6.2.8).

2.6.2.4 Interner Standard

Der interne Standard dient der Kompensation von verlorengegangenen Mengen des Arzneistoffs, die während der Aufbereitung der Probe sowie der Aufenthaltszeit im Autosampler bis zur Analyse verloren gehen könnten.

2.6.2.5 Temperatur

Die Temperatur spielt eine wesentliche Rolle bei der Trennung von Substanzen. Dabei führen höhere Temperaturen zu einer Verringerung der Retentionszeiten sowie einer Viskositätsniedrigung der Substanz und der mobilen Phasen, die zu einem verminderten Druckabfall führen können. Die Temperatur sollte konstant gehalten werden, da viele Detektoren auf Schwankungen sehr empfindlich reagieren. Die Säule sollte in einen Thermostatisierungsofen eingebaut werden.

2.6.2.6 Eluentenflussrate

Wird das Elutionsmittel mit einer entweder zu hohen oder zu niedrigen Geschwindigkeit über die Säule transportiert, kann dies zu einer Verschlechterung der Auflösung führen. Wie aus der van Deemter-Kurve (**Abbildung 2-5**) ersichtlich ist, ist die Trennleistung ebenfalls von der Fließmittelgeschwindigkeit abhängig. Die Geschwindigkeit ist von Länge und Durchmesser der Säule sowie der Teilchengröße des Trennmateri­als abhängig. Die Fließmittelgeschwindigkeit muss der verwendeten Säule angepasst werden. Ein Druckabfall wird durch den Durchmesser des Füllmaterials der Säule sowie der Fließmittelgeschwindigkeit der mobilen Phase beeinflusst. Abhilfe kann hier die Reduzierung der Säule im Durchmesser oder der Länge sowie die Nutzung eines Elutionsmittels mit niedrigerer Viskosität sein.

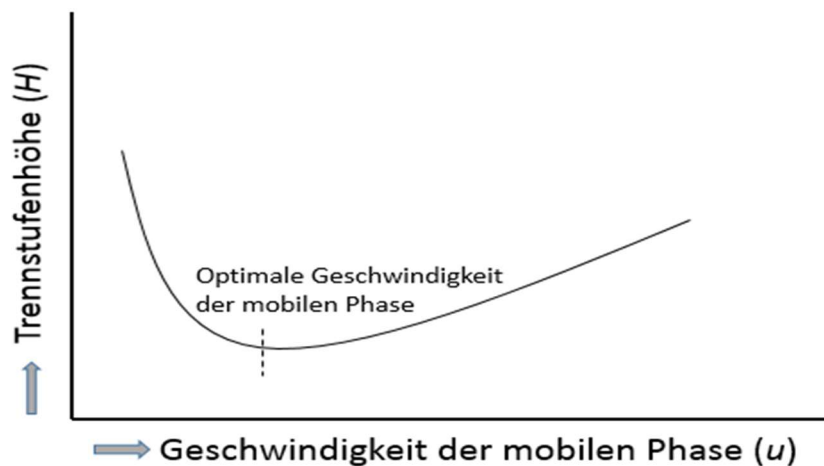


Abbildung 2-5: Van-Deemter-Kurve

2.6.2.7 Pumpen

Die Pumpen sind in der Regel binäre oder quartäre Kolbenpumpensysteme, die eine konstante Fließgeschwindigkeit von 0,1 bis 10 ml/min ausüben. Bis zu 400 bar halten die Pumpen stand. Der Ein- und Auslass des Elutionsmittels wird durch Kugelventile gesteuert. Sie sollen einen möglichst kontinuierlichen Fluss erzeugen. Ein pulsierendes Fließmittel kann im Detektor Signalschwankungen verursachen.

Nach der Benutzung müssen die Pumpen sorgfältig gereinigt werden, dies erfolgt meist durch die Verwendung eines Lösungsmittels sowie bidest. H₂O.

2.6.2.8 UV-Detektor

Bei der UV-Detektion wird die Lichtabsorption des Eluats gemessen. Dabei müssen die Analyten chromophore Gruppen besitzen. Das Lösungsmittel sollte keine Eigenabsorption zeigen und keine Verunreinigungen haben, die ebenfalls absorbieren. Daher sollte immer darauf geachtet werden, dass die verwendeten Lösungsmittel die Reinheit zur Verwendung von HPLC-Zwecken besitzen.

2.6.2.9 Fluoreszenzdetektor

Viele Substanzen können zur Fluoreszenz angeregt werden. Arzneistoffe, die ein oder mehrere Fluorophore besitzen, emittieren Licht für eine sehr geringe Zeit. Das emittierte Licht ist energieärmer als das zuvor absorbierte Licht. Dabei werden die Elektronen unter Absorption von Photonen auf einen höheren angeregten Zustand S1 mit verschiedenen Schwingungsniveaus 0, 1, 2, ausgehend von S0 gebracht, fallen dann strahlungslos in den Schwingungszustand 0 zurück und senden dabei schließlich bei der Rückkehr in den S0-Zustand Fluoreszenzlicht aus. Der Aufbau ist ähnlich wie bei UV-Vis-Detektoren, sie besitzen zwei Monochromatoren für die Anregungs- und Messwellenlänge.

2.6.3 Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Arzneistoffen

2.6.3.1 Ziel der Methodenentwicklung

Im ersten Schritt werden die Ziele definiert, die mit der zu erstellenden Methode erreicht werden sollen. Die Entwicklung einer Methode sollte als Ziel haben, den zu untersuchenden Arzneistoff und dessen Derivate in einer biologischen Matrix, in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Blut, Urin und/oder dem Liquor oder in einem chemischen Gemisch quantitativ bestimmen zu können. Dabei müssen Spezifikationen festgelegt werden wie die Anzahl und Art der Substanzen, der Konzentrationsbereich, innerhalb dessen die Substanzen quantitativ bestimmt werden sollen, die Matrix, aus der die Substanzen bestimmt werden sollen sowie die Präzision, die Richtigkeit und die Linearität der verwendeten Kalibrierkonzentrationen sowie der Messwerte der Analyse und der Ergebnisse. Des Weiteren sollte Wert auf die Robustheit und Selektivität gelegt werden. Änderungen während der Methodenentwicklung sollten schriftlich dokumentiert und in einem Ordner hinterlegt werden. Nach Abschluss der Methodenentwicklung steht ein erster Entwurf der SOP. Der Entwurf sollte vom zuständigen Bereichsleiter sowie nach Möglichkeit einem weiteren sachkundigen Mitarbeiter für die Validierung analytischer Methoden auf Richtigkeit sowie Plausibilität geprüft und abgezeichnet werden

2.6.4 Methodenvalidierung in der HPLC

2.6.4.1 Definition und Kriterien

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode.

Diese erfolgt, wenn eine Methode neu etabliert oder ein neuer Arzneistoff analysiert wird. Falls sich in der Methodenvalidierung systematische Fehler oder eine zu geringe Präzision zeigen, ist auch an den internen Standard als Fehlerursache zu denken (bsp.-weise: Instabilität, Überlagerungen, ggf. Probleme bei der Extraktion).

Nach erfolgter Validierung werden alle relevanten Ergebnisse zusammengetragen, beurteilt und ein Validierungsbericht erstellt. Der Validierungsbericht beinhaltet eine kurze inhaltliche Zusammenfassung, das Ziel und Besonderheiten der angewandten Methode, eine in allen Details nachvollziehbare Beschreibung der Probenvorbereitung, der Probenahme, der Probenmatrix, sowie der Probenlagerung. Des Weiteren sollte im Bericht eine Auflistung der zum Einsatz gekommenen Geräte und Chemikalien, der Qualitätskontrollen und der Kalibratoren erfolgen. Der Anhang kann beispielsweise Chromatogramme enthalten, die die Darstellung der Methode in Form von Peaks unterstreichen können. Der Umfang einer Validierung umfasst folgende Parameter:

2.6.4.2 Präzision

Sie beschreibt das Maß für die Streuung der Analysewerte. Hierbei wird zwischen der Methodenpräzision und der Messpräzision unterschieden. Die Messpräzision erfasst die Schwankungen, die durch das Messgerät verursacht werden und kann durch die Ermittlung einer Mehrfachanalyse (Sechsfachbestimmung) des Standards bestimmt werden. Dabei muss der Variationskoeffizient V_k (**Gleichung 2-4**) herangezogen werden. Der V_k wird in [%] angegeben.

$$Vk = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Gleichung 2-4: Berechnung des Variationskoeffizienten

Der Mittelwert \bar{x} ist ein Schätzwert für den wahren Wert der Messwerte. Er beschreibt die Summe aller Werte dividiert durch die Anzahl der Werte (**Gleichung 2-5**).

Die mathematische Summenformel lautet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

:

Gleichung 2-5: Berechnung des Mittelwertes

Die Standardabweichung s beschreibt das Maß für die Streuung eines Messwertes von ihrem Mittelwert (**Gleichung 2-6**).

Mathematisch lautet die Summenformel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Gleichung 2-6: Berechnung der Standardabweichung

Die Methodenpräzision dient als Maß für die Streuung der Analyseergebnisse und erfolgt mit der Ermittlung der Schwankungen durch eine mehrfache Durchführung der gesamten Analyse, d.h. der Probenvorbereitung, Messung und Auswertung. Um eine Überprüfung der Werte auf Normalverteilung zu testen, wurde der Schnelltest nach David herangezogen. „Die Werte sind mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (meist $P = 99\%$) normalverteilt, wenn der Quotient aus Spannweite R und Standardabweichung s innerhalb

der von David vorgegebenen Grenzwerte befindet“ (Kromidas, 2011). Dazu ist die Tabelle nach David im Anhang aufgeführt.

Zunächst wurde eine Prüfgröße PG, wie oben beschrieben, berechnet (**Gleichung 2-7**):

$$PG = \frac{R}{s}$$

Gleichung 2-7: Berechnung der Prüfgröße nach David

Danach wurden g_u und g_o für die Anzahl der Messwerte und $P = 99\%$ aus der Tabelle nach David entnommen. Der aus der obigen Formel berechnete Wert sollte zwischen g_u und g_o liegen. Falls dies zutrifft, kann von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden.

2.6.4.3 Richtigkeit

Sie ist das Maß für die Abweichung des Messwertes vom richtigen Wert aufgrund eines systematischen Fehlers. Dabei wurde der zu bestimmende Arzneistoff in drei bekannten Konzentrationen mindestens fünffach bestimmt. Der ermittelte Mittelwert sollte um nicht mehr als 15% vom erwarteten wahren Wert abweichen, bei Konzentrationen an der Bestimmungsgrenze wird auch eine Abweichung von bis zu 20% akzeptiert. Des Weiteren beinhaltet die Richtigkeit die Herkunft sowie die Qualität unserer Referenzsubstanzen, die bei GLP-konformen Analysen soweit möglich mit einem Prüfzertifikat sichergestellt werden sollten.

2.6.4.4 Robustheit

Die Robustheit ist das Maß für die Störanfälligkeit durch veränderte Bedingungen (wie beispielsweise das Gerät, die Temperaturschwankungen, das gesamte Labor als Umgebung des Experiments sowie der pH-Wert). Bei allen Versuchen wurde ein Säulenofen verwendet, um die Temperatur der chromatographischen Trennung konstant zu halten. Die Temperaturschwankungen können zu etwaigen Veränderungen der Retentionszeiten sowie zu einer fehlerhaften Trennung der Substanzen führen. Die pH-Werte der Proben sowie des Fließmittels wurde täglich überprüft, das Fließmittel täglich frisch hergestellt. Des Weiteren wurden die Versuchsschritte so geplant, dass keine unnötigen Zeitverluste bei der Probenvorbereitung anfallen, um die Stabilität der Proben nicht zu gefährden.

2.6.4.5 Selektivität

Sie beschreibt die Fähigkeit einer analytischen Methode, einen Analyten, hier ein Arzneistoff, selektiv und quantitativ aus dem Gemisch der Analysenprobe zu bestimmen. Die Leermatrix, aus der der Arzneistoff später bestimmt werden soll, sollte wenn möglich aus mindestens sechs unterschiedlichen Quellen herangezogen sein, um Störsignale, welche durch körpereigene Bestandteile wie Metaboliten, Abbau-Produkte und Begleitmedikation stammen, testen und später ausschließen zu können.

Für die vorliegende Arbeit gilt: Die Transportversuche wurden aus einer Matrix von lyisierten Zellbestandteilen transfizierter HEK-Zellen durchgeführt. Hinzu kam eine Matrix aus HBSS-Medium, ebenfalls mit einem Lysepuffer (Acetonitril/Puffer (80%/20%)) sowie die reine Referenzsubstanz, gelöst in bidest. H₂O. Diese Matrices wurden als Grundlage der Validierung und der Selektivität genutzt.

2.6.4.6 Stabilität

Die Stabilität der Stammlösungen wurde laborintern durch die Bestimmung der Konzentration bei RT zu verschiedenen Zeitpunkten geprüft. War die Konzentration gleich, so war für uns die Stabilität gegeben. Des Weiteren wurden drei Arten der Stabilität analysiert: Zum einen ist es die Kurzzeitstabilität. Sie definiert sich über die Stabilität der Proben zwischen 4 und 24 Stunden. Als zweite Art gibt es die Langzeitstabilität, die angibt, ob die Probe mindestens in der Zeit, in der sie sich zwischen Probennahme und Analyse befindet, stabil bleibt. Als dritte Art wird die Einfrier-Auftau-Stabilität getestet. Dabei wurden die Proben nach Erhalt 24 Stunden eingefroren und später bei RT ohne jegliche Maßnahmen aufgetaut und analysiert. Dieser Zyklus wurde dreimal mit zwei verschiedenen Konzentrationen wiederholt. Eine weitere Form der Stabilität ist die Stabilität der aufgearbeiteten Probe im Probengeber über 24 Stunden bei Reinjektion. Die Robustheit wurde bei allen Versuchen mit einer dreimaligen Wiederholung an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Alle Substanzen waren über einen Zeitraum von 24 Stunden bei RT stabil und haben sich nicht zersetzt.

2.6.4.7 Linearität

Sie beschreibt die Fähigkeit einer Methode, Messergebnisse innerhalb eines Konzentrationsbereichs zu generieren und wird durch die Abhängigkeit der Konzentration oder der Menge des Analyten durch eine Geradengleichung (lineare Regression) beschrieben. Die lineare Funktion lautet (**Gleichung 2-8**):

$$y = ax + b$$

Gleichung 2-8: Berechnung der linearen Regression

Dabei steht y für die Peakfläche, a für eine Konstante, b für die Steigung und x für die zu ermittelnde Konzentration. Analysen mit nichtlinearer Konzentrations-Signalfunktion können valide durch entsprechende Funktionen analysiert werden.

2.6.4.8 Kalibrierkurve

Sie besteht aus fünf bis acht Konzentrationen, die den zu erwartenden gesamten Konzentrationsbereich umfassen. Die Abweichung der Standardkonzentrationen zu den zugehörigen Sollkonzentrationen über dem LLOQ sollte unter 15% liegen. Die Abweichung des LLOQ zur Sollkonzentration darf nicht mehr als 20% betragen. Letztendlich sollten vier aus sechs Standardkonzentrationen innerhalb des aufgeführten Bereichs des LLOQ liegen, die höchste Standardkonzentration inbegriffen.

2.6.4.9 LOD

Die Nachweisgrenze, auch LOD (*Limit Of Detection*) ist die kleinste noch nachweisbare Menge des Arzneistoffs (Konzentration). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Signalstärke (z.B. Peakhöhe oder Peakfläche) dreimal höher als das Hintergrundrauschen des Detektors sein muss (Kromidas, 2011).

2.6.4.10 LOQ

Die Bestimmungsgrenze, auch LOQ (*Limit Of Quantification*) beschreibt die kleinste noch quantifizierbare Menge des Arzneistoffs (Konzentration). Sie liegt bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1 (Kromidas, 2011). Der Variationskoeffizient darf beim LOQ nicht über 20% abweichen.

2.7 In-vitro-Analysen der zellulären Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil

2.7.1 PAMPA-Assay

Das Akronym PAMPA-Assay (*parallelartificial membrane permeability assay*) steht für eine Prüfung, bei der die Permeabilität einer künstlich geschaffenen Membran anhand gewählter Substanzen getestet werden kann. Dabei erfolgt der Übergang durch die

Membran ohne jegliche Transporter und gibt Aufschluss darüber, ob die gewählte Substanz, in dem Fall Proguanil und Cycloguanil, ohne einen nötigen Transporter durch die Membran übertreten kann oder nicht. Die Platten wurden bei -20°C gelagert und zu Beginn des Versuchs 30 Min. auf Raumtemperatur gebracht. Währenddessen wurde eine Verdünnungsreihe mittels der Stammlösung des Arzneistoffs in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) hergestellt. Die Zusammensetzung des PBS-Puffers ist wie folgt:

Zusammensetzung:

Auf 1 Liter destilliertes Wasser:

- di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei 11500,00 mg/L
- Kaliumchlorid 2000,00 mg/L
- Kaliumdihydrogenphosphat 2000,00 mg/L
- Natriumchlorid 80000,00 mg/L

Je 300 µl der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, pH 7.4), welche die aufsteigenden Konzentrationen des Arzneistoffs Proguanil sowie Cycloguanil (0, 125, 250 und 500 µM) enthielten, wurden in die Donor-Positionen auf der Platte und 200 µl des PBS (pH 7,4) in das Gegenstück pipettiert. Die Platte wurde für fünf Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Während der Inkubationszeit von fünf Stunden tritt der Arzneistoff aus der Donorseite in die Lösung der Akzeptorseite über. Am Ende der Inkubation wurden beide Platten, also Donor- und Akzeptorseite, voneinander getrennt, 150 µl von jeder Seite entnommen, in eine 96 Well-Platte pipettiert. Hinzu wurde zum Abgleich die Ausgangskonzentration ebenfalls in die 96 Well Platte pipettiert und die Konzentrationen mittels TECAN bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Durch die UV-Detektion bei 254 nm bei der HPLC lag man hier dicht bei dem Absorptionsmaximum der beiden Arzneistoffe (254 nm und 279 nm).

Die Membranpermeabilität (Pe) (**Gleichung 2-9**) wurde wie folgt bestimmt:

$$Pe = -\ln[1 - KA \times (VA + VD) / (KD \times VD + KA \times VA)] / [A \times (1 / VD + 1 / VA) \times t]$$

Gleichung 2-9: Berechnung der Membranpermeabilität mittels des PAMPA-Assays

KD und KA sind die Konzentrationen der Donor- und Akzeptor-Positionen. VD und VA sind die Flüssigkeitsvolumina der Donor- und Akzeptor-Positionen. A steht für die Membranoberfläche und t für die Inkubationszeit. VD , VA , A und t sind in allen Experimenten mit Werten von 0.3 ml, 0.2 ml, 0.3 cm², und 18,000 s konstant.

2.7.2 HEK-Zellen

2.7.2.1 Arbeiten mit HEK-Zellen

Die Zelllinie HEK293 beschreibt humane embryonale Nierenzellen, welche Anfang der 60iger Jahre des letzten Jahrhunderts von Harvey Shein an der Universität von Harvard etabliert wurden. HEK293 sind hypotriploide adhären wachsende Epithelzellen. Stabil überexprimierende Zelllinien, die jeweils eines der Proteine OCT1, OCT2, OCT3 sowie OCTN1 und OCTN2 exprimierten, waren zuvor am Institut für Klinische Pharmakologie generiert, kodiert und transfiziert worden. Details zur Herstellung dieser Zelllinien sind an anderer Stelle publiziert (Saadatmand et al., 2012). OCT3 wurde freundlicherweise von Prof. Koepsell aus Würzburg zur Verfügung gestellt.

2.7.2.2 Einfrieren von Zellen

In einer frühen Passage wurden die Zellen zum Einfrieren vorbereitet. Aus einer dicht besiedelten Kulturflasche wurden die Zellen mit DME-Medium zu Beginn in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 300 x g für 3 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Laborfuge 400R). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in einem Medium mit einer Zusammensetzung von 90% FCS + 10% DMSO resuspendiert und 2 ml zügig in vier Kryoröhrchen (Nunc®) abgefüllt, beschriftet und sofort in einem

Eisbad (Eis + Eiswasser und NaCl) für eine Stunde kalt gestellt. Nach einer Stunde wurden die befüllten Kryoröhrchen für eine Woche bei -80°C gelagert. Darauf folgend sind die Kryoröhrchen für eine dauerhafte Lagerung in einen mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gefüllten Tank überführt worden.

2.7.2.3 Revitalisieren von eingefrorenen Zellen

Um eine Revitalisierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen zu erreichen, wurden die 4 Kryoröhrchen schnell in einem Wasserbad bei 37°C für 2 min aufgetaut und in ein mit 10 ml vorgewärmten DME-Medium befüllten 50 ml-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 6 ml DME-Medium zum Pellet gegeben und resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine 25 cm^2 Kulturflasche überführt und für 2-3 Tage im CO_2 -Inkubator kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in eine 75 cm^2 Flasche überführt und alle drei Tage passagiert.

Die Ausgangsvitalität war nach zwei bis vier Passagen wieder gegeben. Die Zellen konnten dann experimentell eingesetzt werden.

2.7.2.4 Medium ansetzen

Das DME-Medium wurde mit 50 ml FBS und 5 ml 1%-iger Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. Das DME-Medium enthält 4,5 g/l Glucose, Glutamin und Pyruvat. Das FBS ist fetales Kälberserum.

Dazu wurde das Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt, 55 ml des Mediums abgesaugt, verworfen und anschließend mit 50 ml FBS und 5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) aufgefüllt.

2.7.2.5 Zellenaussaat

Das DME-Medium, versetzt mit FCS und 1%iger Penicillin/Streptomycin, wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Neue Kulturflaschen wurden beschriftet und mit 15 ml des obigen Mediums befüllt. Anschließend wurde das Medium aus den alten Kulturflaschen abgesaugt, mit 3,5 ml Trypsin TrypLE Express (Invitrogen) versetzt und für 5 Minuten im 5% CO₂-Inkubator inkubiert. Dadurch lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen. Trypsin, zugehörig zu den Endopeptidasen, spaltet die Proteine in Aminosäuren. Dadurch kommt es zu einem Abbau von Proteinen, die für die Aufrechterhaltung des Zellverbands nötig sind. Hierdurch haben die Zellen nur einen geringen Halt an der Oberfläche der Petri-Schalen und können leicht durch anschließender Zugabe von 10 ml DME-Medium versetzt mit FCS und 1%iger Penicillin/Streptomycin von dieser gelöst werden. Die Zellen wurden daraufhin sorgfältig vom Boden der Kulturflasche mittels 10 ml Glaspipetten abgespült. Die entstandene Zellsuspension wurde anschließend in eine 50 ml Falcon-Flasche überführt und bei 1400 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgesaugt und das Sediment mit frischem DME-Medium resuspendiert. In die neuen Kulturflaschen wurden 2 ml der Zellsuspension gegeben. 20 µl wurden zur Zählung der Zellen in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben, mit 20 µl DME-Medium sowie 40 µl Trypanblau versetzt und anschließend in der Neubauer-improved-Zählkammer gezählt.

2.7.2.6 Zählen der Zellen

Die Anzahl der Zellen wird mittels der Neubauer-improved-Zählkammer bestimmt. Dabei werden 20 µl DME-Medium, 20 µl Zellsuspension sowie 40 µl Trypanblau vermischt. Die Unterscheidung der toten zu den lebendigen Zellen basiert auf der Tatsache, dass der Farbstoff Trypanblau von den lebenden Zellen zurück in das Medium gespült wird. Unter dem Mikroskop erscheinen die lebendigen Zellen daher heller als deren blaue Umgebung. Tote Zellen hingegen können den blauen Farbstoff nicht in das Medium zurückführen und bleiben dunkelblau. Die Neubauer-improved-Zählkammer ist eine 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte, die so konzipiert ist, dass 16 Felder zu je 4 Kompartimenten in der Mitte der Glasplatte angeordnet und als Vertiefung dargestellt sind.

Vor der Aufgabe der Probe wurde ein Deckglas auf die Vertiefung gegeben und 10 μ l Probe unter das Deckgläschen pipettiert. Die Probe verteilte sich in die einzelnen Kompartimente. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen gezählt und der Mittelwert aus den vier Quadraten bestimmt, sodass sich die Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$ ergibt. Für die Erythrozyten wurde ebenfalls die Neubauer-improved-Zählkammer benutzt, die ein zusätzliches Kompartiment in der Mitte der vier Kompartimente enthält, welches zur Zellzählung von Erythrozyten genutzt werden kann (siehe Kapitel 2.8.2).

2.7.2.7 Proteinmessung

Die BCA-Lösung wurde bereits durch Smith et al. im Jahre 1985 (Smith et al., 1985) beschrieben. Die Detektion basiert auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} -Ionen durch das Protein. Aus dem Proteinkomplex entsteht ein Komplex mit dem Reagenz „Bicichoninic-Acid“. Die Stickstoffatome sind für die Komplexbildung mit dem Cu^{+} -Ion verantwortlich, die Carboxylgruppen dienen der Wasserlöslichkeit des Komplexes und des Reagenzes. Bei einer Wellenlänge von 562 nm erreicht es ein Absorptionsmaximum. Bei diesem Versuch wird die absolute Proteinkonzentration durch die Farbänderung der Probenlösung von Grün zu Violett (Cu^{2+} zu Cu^{+}) durch die obige Reaktion proportional zur Proteinkonzentration dargestellt, welche durch colorimetrische Methoden bestimmt werden kann. Die Herstellung der BCA-Kupfersulfat-Lösung erfolgte auf der Grundlage, dass 50 Anteile der BCA-Lösung mit zwei Anteilen Kupfersulfat-Lösung 4% homogen vermischt wurden (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Kupfersulfat- Lösung

Kupfersulfat-Pentahydrat-Lösung	Menge
CuSO_4	2 mg
bidest. H_2O	50 ml

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der BSA- Lösung

BSA Stammlösung (1mg/ml)	Menge
BSA	50 mg
H_2O	50 ml

Die BCA-Proteinprobenlösung wurde folgendermaßen hergestellt:

- 10 µl der Proteinproben wurden in eine der Probenpositionen der transparenten 96 Well-Platte (Sarstedt) pipettiert.
- 200 µl der BCA-Kupfersulfat-Lösung wurden hinzugefügt.

Anschließend wurde die Platte bei 37⁰C für 30 Minuten inkubiert, die Proteinabsorption bei einer Wellenlänge von 570 nm im Tecan Ultra Microplate device (Tecan, Crailsheim) durch eine Standardreihe von fünf verschiedenen Konzentrationen an Rinder-Albumin-Serum (BSA)-Lösung (**Tabelle 2-4**) analysiert und bestimmt. Die BSA-Konzentrationen für die Standardkurve wurden in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10, 15 mg/ml hergestellt. Dazu wurden die Mengen von 0, 1, 5, 10, 15 µl der BSA-Stammlösung (1 mg/ml) dreifach in freie Positionen auf einer 96 Well Platte gegeben und ebenfalls mit 200 µl der BCA-Kupfersulfat-Lösung versetzt. Daraus konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.7.3 Versuch der direkten Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil an mit OCT transfizierten HEK293-Zellen

Die direkte Aufnahme bestimmter Arzneistoffe in die Zellen wurde bereits durch (Tzvetkov et al., 2011) beschrieben. Die 100 mm-Platten (BD Falcon, Heidelberg, Germany) wurden mit 3, 5 ml Poly-D-lysin (P0296, Sigma-Aldrich) versetzt und für 30 Minuten im 5 % CO₂-Inkubator inkubiert. Das Poly-D-lysin wurde wieder abgesaugt und die Platten offen unter der Sterilbank für ca. 30 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die benötigten Zellen, die vorher in der Neubauer-improved-Zählkammer gezählt wurden, mit DME-Medium auf die Platten gegeben und für 48 Stunden bei 37⁰C bis zum Erreichen ihrer gewollten Menge von neun Millionen Zellen inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Am Versuchstag wurden die Zellen vor dem Zellversuch mit 10 ml vorgewärmtem HBSS-Medium (pH 7.4) gewaschen. Dadurch wurden tote Zellen, die nicht mehr am Boden haften konnten, entfernt. Der Versuch startete durch die Zugabe von 5 ml vorgewärmtem HBSS-Medium (pH 7.4) mit 2 µM Arzneistoff Proguanil und Cycloguanil (Cycloguanil nur an OCT1, weitere Versuche mit Cycloguanil mit 30 µM) auf die mit OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, OCTN2 und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen, die den 0 = Wert und somit die Kontrolle darstellen, da pcDNA5 der Vektor ohne

einen Transporter ist. Anschließend wird der Versuch der Hemmung des direkten zellulären Transports durch die gleichzeitige Zugabe von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) beobachtet.

Die Zellen werden mit dem mit Arzneistoff versetzten HBSS-Medium für 2 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird mittels 20 ml eiskaltem HBSS-Medium (pH 7.4) gestoppt. Anschließend werden die Zellen erneut mit 20 ml eiskaltem HBSS-Medium gewaschen und in 2 ml eiskaltem HBSS Medium (pH 7.4) resuspendiert und in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und sofort auf Eis gelegt. Die Eppendorfgefäße werden anschließend bei 2000 rpm 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert und erneut mit 1 ml eiskaltem HBSS-Medium (pH 7.4) gewaschen. Ein Anteil von 250 µl Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses dient der Bestimmung der Proteinkonzentration, um die Anzahl der Zellen an die jeweilige Probe anzupassen. Der restliche Anteil an Zellsuspension wird erneut bei 2000 rpm 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, wobei sich ein Pellet absetzt. Der Überstand wird entnommen und verworfen. Die Zellen werden anschließend durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer, der bereits den internen Standard Pyrimethamin enthielt, lysiert. Der Lysepuffer besteht zu 80% aus Acetonitril und 20% aus dem Laufpuffer, der anschließend zur Quantifizierung der Probe mittels HPLC eingesetzt wird. Die Proben werden nach kurzem intensivem Schütteln bei 13000 rpm 10 Minuten lang erneut bei 4°C zentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen. Der Überstand wird in ein Zentrifugengläschen überführt und bei 40°C unter der Zugabe von Stickstoff knapp 60 Minuten abgedampft. Der Niederschlag wird durch Zugabe von 200 µl Laufpuffer wieder aufgenommen und durch Schütteln gelöst. 100 µl dieser Lösung werden in 100 µl HPLC-Gläschen zur Messung pipettiert und ein Anteil von 50 µl dieser Lösung wurde daraufhin aus dem HPLC-Gläschen im Autosampler injiziert. Die HPLC-Bedingung ist in dem Kapitel Probenaufgabe von Proguanil, Cycloguanil und Pyrimethamin erläutert.

2.7.4 Versuch der konzentrationsabhängigen Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil

Für die konzentrationsabhängige Aufnahme werden die Zellen für 2 Minuten mit 5 ml vorgewärmtem HBSS-Medium (pH 7.4), welches die jeweiligen Konzentrationen enthält, versetzt. Die Konzentrationen, die zur Bestimmung der zellulären Aufnahme an OCT1, OCT2 und OCT3- transfizierten HEK293-Zellen gewählt wurden, lagen bei 2, 5, 10, 20, 30, 50, 100 und 250 μM für Proguanil und Cycloguanil. Die K_M - und V_{max} -Werte wurden anhand der Michaelis-Menten-Gleichung mittels Sigma Plot Software, Version 12.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) bestimmt. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter Kapitel 2.7.3.

2.7.5 Messungen zur Inhibition der Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch andere Pharmaka

Die Auswirkung der zellulären Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil an OCT1 wird anhand der Wechselwirkungen mit zehn Arzneistoffen experimentell bestimmt. Die Auswahl dieser Arzneistoffe basierte darauf, dass sie entweder typischerweise in Ko-Medikation gegeben werden könnten oder darauf, dass sie bekannte Hemmstoffe organischer Kationentransporter sind. Dabei wird jeweils Proguanil sowie Cycloguanil einzeln mit zehn verschiedenen Arzneistoffen je mit deren zweifachen, zehnfachen sowie zwanzigfachen Menge an C_{max} versetzt und 2 Minuten inkubiert. Der Ablauf des Versuchs ist identisch zur Inhibition mit MPP^+ . Die Arzneistoffe mit deren Konzentrationen an C_{max} sind in **Tabelle 2-5** aufgeführt:

Tabelle 2-5: Angewandte Arzneistoffe zur Messung einer möglichen Inhibition des Influx-Transportes von Proguanil und Cycloguanil

<u>Name</u>	<u>2xC_{max}</u> <u>[μM]</u>	<u>10xC_{max}</u> <u>[μM]</u>	<u>20xC_{max}</u> <u>[μM]</u>
Doxycyclin	30	150	300
Chinin	15	75	150
Chloroquin	3	15	30
Hydroxychloroquin	2,5	12,5	25
Mefloquin	10	50	100
Metformin	1,5	7,5	15
Metoprolol	2	10	20
Omeprazol	22	110	220
Ondansetron	1,5	7,5	15
Rabeprazol	6	30	60

2.7.6 Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch Proteinvarianten von OCT1

Bei diesen Analysen ging es um erbliche Varianten von OCT1, die natürlicherweise in der menschlichen Bevölkerung auftreten. Dabei wurden von mir fünf Polymorphismen gewählt, die häufig in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen. Dabei handelt es sich um die Proteinvarianten, **Arg61Cys**, **Gly401Ser**, **Cys88/Met420del**, **Met408Valin/Met420del**, sowie **Gly465Arg/Metdel420del**. Zusätzlich wurde die Variante **Ser14Phe** untersucht, die nicht bei den Kaukasiern auftritt. Der Versuchsablauf erfolgt bei 37°C durch die Zugabe von 2 μ M Proguanil oder 30 μ M Cycloguanil bei einer Inkubationszeit von 2 Minuten. Alle weiteren Schritte sind identisch zu den vorherigen Versuchen (Kapitel 2.7.3).

2.8 Erythrozyten

2.8.1 Arbeiten mit Erythrozyten

Das Vollblut wurde frisch gewonnen und 1:1 mit einer isotonischen Kochsalzlösung oder dem HBSS-Medium (pH = 7,4) verdünnt. Anschließend wurde die Verdünnung bei 500 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Der gesamte Überstand nach der Zentrifugation wurde verworfen und die zurückgebliebenen Erythrozyten wurden resuspendiert. (1 ml in 4 ml HBSS-Medium 37°C). Daraufhin wurden die Erythrozyten gezählt. Dies erfolgte in der Neubauer-improved-Zählkammer. Die Lösung wurde dazu 1:200 verdünnt und 5 µl Erythrozyten-Suspension mit 995 µl HBSS-Medium versetzt. Aus der verdünnten Lösung habe ich 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt und in das mittlere Feld der Neubauer-improved-Zählkammer gegeben, gezählt und berechnet. Zu Beginn wurde von uns festgelegt, dass sich in 200 µl Probe 25 Millionen Zellen befinden sollten. Dies wurde in den Berechnungen berücksichtigt.

Anschließend wurde mit Proguanil verschiedener Konzentrationen inkubiert und die Reaktion wurde mit 1000 µl eiskaltem HBSS-Medium gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gelegt und 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgesaugt, die Zellen, die als Sediment vorlagen, resuspendiert und erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Sediment in 1000 µl eiskaltem HBSS-Medium resuspendiert. Ein Anteil von 250 µl der Probe wurde für die Proteinmessung in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden alle Eppendorfgefäße erneut wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das vorliegende Sediment in einem Lysepuffer aufgenommen. Der Lysepuffer für die Proben enthielt zu 80% Acetonitril und zu 20% Laufpuffer. Die Sedimente zur Proteinmessung wurden mit einem Gemisch aus 10% SDS/NaOH 0,1N versetzt. Es erfolgte das kurze intensive Schütteln der Proben, bevor alle Eppendorf-Gefäße für 10 Minuten bei 13.000 rpm Umdrehungen mit der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert wurden.

Die jeweiligen Überstände der Eppendorf-Gefäße mit den Proben wurden in ein Zentrifugengläschen überführt, eingedampft und in 200 µl Laufpuffer wieder aufgenommen.

100 µl der Eluens-Probenmischung wurden im HPLC-Gläschen pipettiert, 100 µl in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß zurückhalten. Das Injektionsvolumen für die HPLC betrug 50 µl.

2.8.2 In-vitro-Analyse der erythrozytären Aufnahme von Proguanil

2.8.2.1 Versuch der Aufnahme von Proguanil mit und ohne MPP⁺

Die Aufnahme von Proguanil durch die Erythrozyten wurde in Punkt 2.10.3 beschrieben. Dabei wurde zunächst die Aufnahme von 2 µM und 20 µM Proguanil bei 2 Minuten Inkubationszeit bei RT und 4°C durchgeführt. Bei 4°C gehen wir davon aus, dass die Transporterproteine inaktiv sind. Des Weiteren wurde bei RT durch die Zugabe von MPP⁺ die Inhibition von OCT1-3 getestet. MPP⁺ ist ein spezifischer Inhibitor des organischen Kationentransporters OCT1-3.

2.8.2.2 Versuch der zeitabhängigen Aufnahme von Proguanil

Hierbei wurde die zeitabhängige Aufnahme von 2 µM sowie 20 µM Proguanil in die Erythrozyten untersucht. Dabei wurde der Versuch von 2.8.2.1 mit den Inkubationszeiten 2, 5, 10 min durchgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden alle Proben auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C zentrifugiert. Der Versuchsablauf erfolgte wie bei 2.8.1.

2.8.2.3 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil

Proguanil wurde bei den Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Aufnahme bei verschiedenen Konzentrationen (2, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 µM) in 200 µl Erythrozytenlösung untersucht. Der Versuchsablauf kann bei 2.10.3 eingesehen werden. Dabei erfolgte die Aufnahme bei RT sowie bei 4°C.

2.8.2.4 Inhibition der Aufnahme von Proguanil durch Ko-Medikation

Der Versuchsablauf erfolgte identisch zu 2.10.3. Eine 200 µl-Erythrozytenlösung enthielt **2 µM** Proguanil sowie die in der folgenden **Tabelle 2-6** aufgelisteten Substanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei wurde untersucht, ob und inwieweit es zu einer Inhibition des Transports von Proguanil kommt. Die Auswahl der Substanzen erfolgte durch die Affinität zu den einzelnen Kationentransportern. Der Versuch wurde sowohl bei RT als auch bei 4°C ausgeführt.

Tabelle 2-6: Arzneistoffe zur Hemmung des Transports von Proguanil durch die Erythrozytenmembran

<u>Name der Substanz</u>	<u>Konzentration [µM]</u>
Verapamil	2
Carnitin	1
TBA	2
Narinigin	0,5
MPP ⁺	2

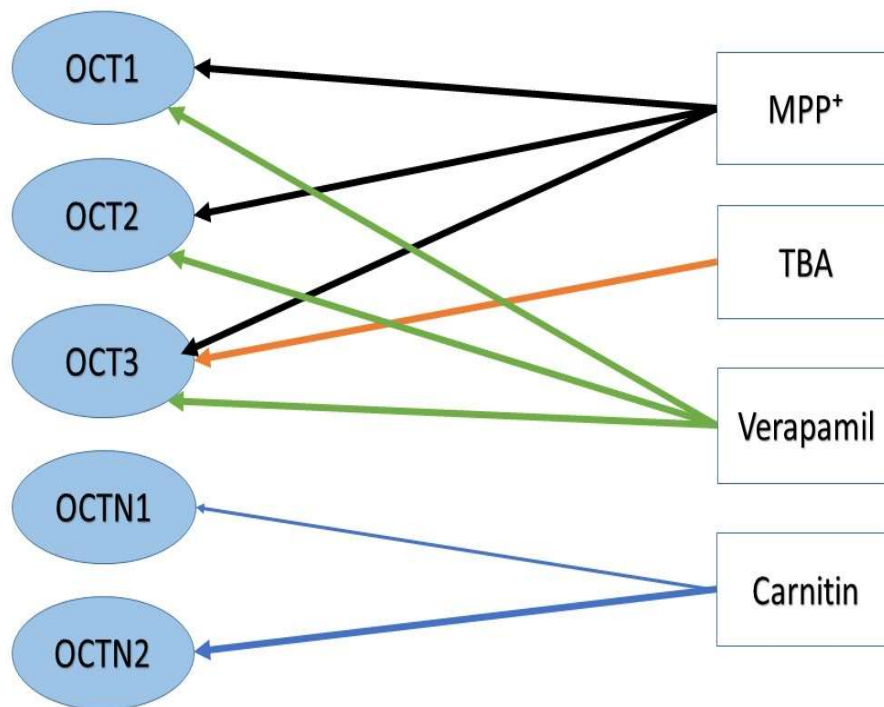


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Inhibitoren zu den einzelnen organischen Kationentransportern

MPP⁺ zeigt sich als guter Inhibitor für OCT1, OCT2 und OCT3, jedoch nicht für OCTN1 und OCTN2. TBA (**Abbildung2-6**) ist spezifisch für OCT3. Carnitin dient als Substrat für beide Carnitin- Transporter OCTN1 und OCTN2, wobei OCTN1 auch Ergothionein als biogenes Substrat hat.

2.9 Probenvorbereitung von Proguanil, Cycloguanil und Pyrimethamin

2.9.1 Verdünnungsreihen

Stammlösungen für Proguanil, Cycloguanil und Pyrimethamin wurden basierend auf 10 mM und 20 mM Stammlösungen hergestellt. Die Berechnung der einzelnen Konzentrationen erfolgte in folgenden Schritten:

1. **Proguanil** ($C_{11}H_{16}ClN_5$, M_w 253,731 g/mol)

1 mg/ml: 394 μ l einer 10 mM Proguanil-Stammlösung wurden mit 606 μ l bidest. H_2O verdünnt.

4 ng/ μ l: 1 mg/ml Proguanil-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H_2O versetzt.

0.4 ng/ μ l: Die oben erhaltene 4 ng/ μ l-Lösung wurde erneut 1:1 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

0.04 ng/ μ l: Die obige Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

1 ng/ μ l: Hierzu wurde die 4 ng/ μ l-Proguanil-Lösung wurde 1:4 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 1 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

Die Testlösungen wurden wie folgt berechnet und injiziert:

Testlösung 1 mit 2500 ng Proguanil.

Testlösung 2 mit 100 ng Proguanil: Injiziert wurden 50 μ l einer 2 ng/ μ l-Lösung.

Testlösung 3 mit 50 ng Proguanil: Eine 2 ng/ μ l-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H_2O zu einer 1 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

Testlösung 4 mit 10 ng Proguanil: Eine 1 ng/ μ l-Lösung wurde 1:5 mit bidest. H_2O zu einer 0,2 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

Testlösung 5 mit 5 ng Proguanil: Eine 0,2 ng/ μ l-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H_2O zu einer 0,1 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

Testlösung 6 mit 1 ng Proguanil: Eine 0,2 ng/ μ l-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O zu einer 0,02 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

Testlösung 7 mit 0,5 ng Proguanil: Eine 0,2 ng/ μ l-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H₂O zu einer 0,1 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Diese wurde wiederum 1:10 mit bidest. H₂O zu einer 0,01 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

2. Cycloguanil(C₁₁H₁₄ Cl N₅, M_w 251,715 g/mol)

1 mg/ml: 198 μ l einer 20 mM Cycloguanil-Stammlösung wurden mit 802 μ l bidest. H₂O verdünnt.

4 ng/ μ l: 1 mg/ml 4-Cycloguanil-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H₂O versetzt.

0.4 ng/ μ l: Die oben erhaltene 4 ng/ μ l-Lösung wurde erneut 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

0.04 ng/ μ l: Die obige Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

1 ng/ μ l: Die 4 ng/ μ l Cycloguanil-Lösung wurde 1:4 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 1 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

Testlösungen wurden wie bei Proguanil hergestellt und injiziert.

3. Pyrimethamin (C₁₂H₁₃ Cl N₄, M_w 248,715 g/mol)

1 mg/ml: 402 μ l einer 10 mM Pyrimethamin-Stammlösung wurden mit 598 μ l bidest. H₂O verdünnt.

4 ng/μl: 1 mg/ml Pyrimethamin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 100 ng/μl-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μl entnommen und mit 960 μl bidest. H₂O versetzt.

2 ng/μl: 4 ng/μl Pyrimethamin-Lösung wurde 1:4 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 1 ng/μl-Lösung zu erhalten. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung. Sie diente als interner Standard.

Alle Lösungen wurden bei 4°C gelagert, außer die Stammlösungen [mM]. Diese lagerten bei -20°C.

2.9.2 HPLC-Bedingungen und angewandte Materialien

Um die Konzentration von Proguanil und Cycloguanil bestimmen und analysieren zu können, wurde wie bei Debrisoquin und Amisulprid das LaChrom-HPLC-System von Merck-Hitachi genutzt, mit dem Unterschied der Nutzung eines UV-Detektors (L-7400, Merck Hitachi).

Die Trennung der Substanzen erfolgte an einer LiChrospher 60 RP-select (5 μm, 4 × 250 mm) Säule verbunden mit einer LiChrospher 4-4,100CN Vorsäule (5 μm, beides von Merck). Die Peaks für Proguanil, Cycloguanil und Pyrimethamin als interner Standard erfolgten bei einer Wellenlänge von 254 nm, anlehnend an die Publikation von (Edstein, 1986). Eine isokratische Methode wurde von mir gewählt mit der Zusammensetzung von 20% (v) Acetonitril und 80% (v) 0.115 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 2,6. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 85%iger Phosphorsäure eingestellt. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Alle Messung wurde bei 25°C mittels eines Thermostatisierungsofens, in dem die Säule fixiert wurde, durchgeführt. Die Retentionszeiten lagen für Cycloguanil, Progaunil und Pyrimethamin bei ca. 8 Minuten, 33 Minuten und 20 Minuten. Die Peakflächen und die damit verbundene Konzentrationen wurden mithilfe eines externen Standardisierungsverfahrens durch die Nutzung einer Kalibriergerade bestimmt. Die Mengen an Progaunil und Cycloguanil, die in den intrazellulären Raum der Zelle gelangten und anhand der

Peakfläche angegeben wurden, konnten anhand der gemessenen Mengen an Proteinen wie bei den beiden obigen Teilprojekten durch die Proteinmessung bestimmt werden.

2.10 Probenvorbereitung von Amisulprid, Sultoprid, Tiaprid, und Metoclopramid

2.10.1 Verdünnungsreihen

Stammlösungen für Amisulprid, Sultoprid und Tiaprid und Metoclopramid wurden basierend auf 10 mM und 5 mM Stammlösungen hergestellt. Die Berechnung der einzelnen Konzentrationen erfolgte in folgenden Schritten:

1. Amisulprid ($C_{16}H_{25}N_3$, M_w 177,0 g/mol)

1 mg/ml: 270,65 μ l einer 10 mM Amisulprid-Stammlösung wurden verdünnt mit 729,35 μ l bidest. H_2O .

4 ng/ μ l: 1 mg/ml Amisulprid-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H_2O versetzt.

2 ng/ μ l: Die oben erhaltene 4 ng/ μ l-Lösung wurde erneut 1:2 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 2 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

0.2 ng/ μ l: Die obige Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0,2 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

Sieben Testlösungen mit Amisulprid als Reinsubstanz wurden mit folgenden Konzentrationen ausgeführt:

Testlösung 1 mit 100 ng Amisulprid: Eine 4 ng/ μ l-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H_2O zu einer 2 ng/ μ l-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μ l dieser Lösung.

Testlösung 2 mit 50 ng Amisulprid: Eine 2 ng/μl-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H₂O zu einer 1 ng/μl-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

Testlösung 3 mit 10 ng Amisulprid: Eine 1 ng/μl-Lösung wurde 1:5 mit bidest. H₂O zu einer 0,2 ng/μl-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

Testlösung 4 mit 5 ng Amisulprid: Eine 0,2 ng/μl-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H₂O zu einer 0,1 ng/μl-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

Testlösung 5 mit 1 ng Amisulprid: Eine 0,2 ng/μl-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O zu einer 0,02 ng/μl-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

Testlösung 6 mit 0,5 ng Amisulprid: Eine 0,2 ng/μl-Lösung wurde 1:2 mit bidest. H₂O zu einer 0,1 ng/μl-Lösung verdünnt. Diese wurde wiederum 1:10 mit bidest. H₂O zu einer 0,01 ng/μl-Lösung verdünnt. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

Testlösung 7 mit 0,1ng Amisulprid: Eine 0,2 ng/μl-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 0,02 ng/μl-Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde erneut 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 0,002 ng/μl-Lösung zu erhalten. Injiziert wurden 50 μl dieser Lösung.

2. **Metoclopramid- Hydrochlorid Monohydrat** (C₁₄H₂₂ ClN₃ O₂ HCl H₂O, M_w 354,27 g/mol)

1 mg/ml: 282,27 μl einer 10 mM Metoclopramid-Stammlösung wurden mit 717,73 μl bidest. H₂O verdünnt.

4 ng/μl: 1 mg/ml Metoclopramid-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 100 ng/μl-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μl entnommen und mit 960 μl bidest. H₂O versetzt.

1 ng/μl: Eine 4 ng/μl-Metoclopramid-Lösung wurde 1:4 mit bidest. H₂O verdünnt, um eine 1 ng/μl-Lösung herzustellen.

Die Testlösung von 25 ng/ml Metoclopramid erfolgte durch das Injizieren von 50 μl der obigen Lösung.

Für Sultopirid und Tiaprid wurden die Berechnungen wie bei Amisulprid durchgeführt. Alle Lösungen wurden bei 4⁰C gelagert, außer die Stammlösungen (mM). Diese lagerten bei -20⁰C.

2.10.2 HPLC- Bedingungen und angewandte Materialien

Um die Konzentration von Amisulprid, Sultoprid und Tiaprid bestimmen und analysieren zu können, wurde das oben beschriebene LaChrom-HPLC-System von Merck-Hitachi genutzt.

Die Trennung der Substanzen erfolgte an einer LiChrospher RP18e (5 µm, 4 × 125 mm) Säule, verbunden mit einer LiChrospher 4-4,100CN Vorsäule (5 µm, beides von Merck). Die Peaks wurden bei einer Anregung von 374 nm und einer Emission von 370 nm anlehnend an die Publikation von (Cerqueira et al., 2000) bestimmt. Eine isokratische Methode wurde von mir gewählt mit der Zusammensetzung von 12% (v) Acetonitril und 88% (v) 0.03M Kaliumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 6,5. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Triethylamin eingestellt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Zusammensetzung des Laufpuffers für Sultoprid und Tiaprid lag bei 10% Acetonitril und 90 % 0,03M Kaliumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 6,5. Alle Messungen wurden bei 40⁰C durch einen Säulenofen, wie oben bei Debrisoquin bereits beschrieben, durchgeführt. Die Retentionszeiten lagen mit einer Abweichung von +/- 5% für Amisulprid und Metoclopramid ca. bei 9,3 Minuten und 12,3 Minuten. Die Berechnung und Auswertung erfolgte wie bei Debrisoquin.

2.11 Probenvorbereitung Debrisoquin, 4-Hydroxydebrisoquin und Venlafaxin

2.11.1 Verdünnungsreihen

Stammlösungen für Debrisoquin, 4-Hydroxydebrisoquin und Venlafaxin wurden basierend auf 10 mM und 5 mM Stammlösungen hergestellt. Die Berechnung der einzelnen Konzentrationen erfolgte in folgenden Schritten:

1. Debrisoquin ($C_{16}H_{25}N_3$, M_w 177,0 g/mol)

1 mg/ml: 570 μ l einer 10 mM Debrisoquin-Stammlösung wurden verdünnt mit 621 μ l bidest. H_2O .

4 ng/ μ l: 1 mg/ml Debrisoquin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H_2O versetzt.

0.4 ng/ μ l: Die oben erhaltene 4 ng/ μ l-Lösung wurde erneut 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

0.04 ng/ μ l: Die obige Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

1 ng/ μ l: Die 1 mg/ml-Debrisoquin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 10 μ l entnommen und mit 990 μ l bidest. H_2O versetzt.

1. **4-Hydroxydebrisoquin** ($C_{10}H_{15}N_3O$, M_w 191,2 g/mol)

1 mg/ml: 822 μ l einer 5 mM Debrisoquin-Stammlösung wurden verdünnt mit 198 μ l bidest. H_2O .

4 ng/ μ l: 1 mg/ml 4-Hydroxydebrisoquin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H_2O versetzt.

0.4 ng/ μ l: Die oben erhaltene 4 ng/ μ l-Lösung wurde erneut 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

0.04 ng/ μ l: Die obige Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um 1 ml der 0.4 ng/ μ l-Lösung zu erhalten.

1 ng/ μ l: Die 1 mg/ml-4-Hydroxydebrisoquin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 10 μ l entnommen und mit 990 μ l bidest. H_2O versetzt

2. **Venlafaxin** ($C_{17}H_{27}NO_2$, M_w 277,40 g/mol)

1 mg/ml: 144 μ l einer 5 mM Venlafaxin-Stammlösung wurden verdünnt mit 56 μ l bidest. H_2O .

4 ng/ μ l: 1 mg/ml Venlafaxin-Lösung wurde 1:10 mit bidest. H_2O verdünnt, um eine 100 ng/ μ l-Lösung zu erhalten. Von dieser wurden 40 μ l entnommen und mit 960 μ l bidest. H_2O versetzt.

Alle Lösungen wurden bei 4⁰C gelagert, außer die Stammlösungen (mM). Diese lagerten bei -20 ⁰C. Drei Standardtests erfolgten mit 100 ng, 10 ng und 1 ng 4-Hydroxydebrisoquin, wobei jeweils 50 μ l einer 4 ng/ μ l für 100 ng, 0,4 ng/ μ l für 10 ng und einer

0,04 ng/μl sowie für 1 ng mit je 50 μl einer 4 ng/μl Venlafaxin-Lösung als internen Standard versetzt und schließlich 50 μl jeder Probe injiziert wurden.

2.11.2 HPLC- Bedingungen und angewandte Materialien

Um die Konzentration von Debrisoquin bestimmen und analysieren zu können, wurde ein LaChrom-HPLC-System von Merck-Hitachi genutzt, welches aus folgenden Komponenten zusammengesetzt war:

- Ein Interface (D-7000, Merck-Hitachi),
- Eine Pumpe (L-7485, Merck-Hitachi),
- Ein Autosampler (L-7200, Merck-Hitachi),
- Ein Fluoreszenzdetektor (L-7400, Merck-Hitachi) sowie ein Entgaser (L-7614, Merck-Hitachi).

Die Trennung der Substanzen erfolgte an einer LiChrospher 100 CN (5 μm, 4 × 150 mm) Säule, verbunden mit einer LiChrospher 4-4,100CN Vorsäule (5 μm, beides von Merck). Die Peaks für Debrisoquin und Venlafaxin als interner Standard erfolgten bei einer Extinktion von 210 nm und einer Emission von 290 nm, anlehnend an die Publikation von (Cerqueira et al., 2000). Eine isokratische Methode wurde von mir gewählt mit der Zusammensetzung von 5% (v) Acetonitril und 95% (v) 0.05 M Natriumacetatpuffer (pH-Wert = 5,0). Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Essigsäure 99% eingestellt. Die Flussrate betrug 0.7 ml/min.

Alle Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C mittels eines temperierten Ofens, in dem sich die Säule befand, durchgeführt. Die Retentionszeiten lagen für Debrisoquin und Venlafaxin etwa bei 9 Minuten und 16 Minuten. Die Peakflächen und die damit verbundenen Konzentrationen wurden mithilfe eines externen Standardisierungsverfahrens durch die Nutzung einer Kalibriergeraden bestimmt. Die Menge an Debrisoquin, die in den intrazellulären Raum der Zelle gelangte und anhand der Peakfläche angegeben wurde, konnte anhand der vollständigen Menge an Proteinen durch die Proteinmessung berechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung von OCT1 für die zelluläre Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil

3.1.1 Methodenvalidierung

Es ging zunächst um die Frage, welcher Transporter die Substanzen Proguanil und Cycloguanil in die Zelle transportiert, um dann anschließend auch zu untersuchen, welche Bedeutung dabei die Polymorphismen haben. Um die Aufnahme und Inhibition von Proguanil und Cycloguanil an den oben genannten OCT-transfizierten HEK293-Zellen mittels HPLC zuverlässig und präzise bestimmen zu können, wurde die Methode von (Edstein, 1986) modifiziert und validiert (siehe 2.7.2). Anschließend konnten die einzelnen Parameter der Methodenvalidierung berechnet werden. Die Bestimmung der Konzentrationen von Proguanil und Cycloguanil für die In-vitro-Versuche mittels OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1 und OCTN2-transfizierter HEK293-Zellen erfolgte mithilfe von Kalibratoren und der Erstellung einer Kalibriergeraden.

3.1.2 Kalibratoren für Proguanil und Cycloguanil

Es wurden sieben Kalibratoren in den Konzentrationen 1, 5, 10, 50, 100, 200 und 2500 ng/ml für Proguanil sowie fünf Kalibratoren für Cycloguanil in den Konzentrationen 1, 5, 10, 100 und 2500 ng/ml hergestellt. Sie wurden mittels Dreifachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen bestimmt. Die Verdünnungsreihe ist in der Methodenbeschreibung (Kapitel 2.9) aufgeführt. Die Anzahl der jeweiligen Kalibratoren (n) zur statistischen Berechnung lag bei 10.

3.1.3 Qualitätskontrollen

Es wurden drei Qualitätskontrollen zu Beginn der Messversuche hergestellt und bei -20°C gelagert. An jedem Versuchstag wurden sie aufgetaut und mit vermessen. Sie lagen für Proguanil sowie Cycloguanil im Konzentrationsbereich von 1, 100, und 2500 ng/ml. Die Anzahl der jeweiligen Qualitätskontrollen (n) zur statistischen Berechnung lag bei 10.

3.1.4 Präzision

Wie bei 2.2.3.2 bereits definiert und erwähnt, wurde die Präzision der Kalibratoren sowie der Qualitätskontrollen anhand der erläuterten Tests bestimmt.

3.1.4.1 Präzisionsberechnung der Kalibratoren

Zur Berechnungen der Präzision liegen in **Tabelle 3-1** die statistischen Werte für den Mittelwert, die Standardabweichung sowie den Variationskoeffizienten der einzelnen Kalibratoren (K) für Proguanil und Cycloguanil vor.

Tabelle 3-1: Auswertung der statistischen Daten der Kalibratoren für Proguanil

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
\bar{x}	0,84	4,65	8,88	47,10	96,53	228,02	2496,04
s	0,13	0,84	1,30	5,92	4,45	33,43	14,54
vk	0,15	0,18	0,15	0,13	0,05	0,15	0,01

Tabelle 3-2: Auswertung der statistischen Daten der Kalibratoren von Cycloguanil

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]
\bar{x}	1,45	6,02	11,10	47,81	106,01	2500,70
s	0,20	0,86	1,81	4,55	8,75	1,82
Vk	13,59	14,29	16,27	9,52	8,25	0,07

Anschließend wurde anhand der **Gleichung 2-7** die Prüfgröße nach *David* bestimmt und mit dem tabellarischen Wert aus der *David*-Tabelle im Anhang verglichen. Die Berechnung erfolgte für alle Kalibratoren. Dabei ergab sich folgende Auswertung (**Tabelle 3-3**) für Proguanil und Cycloguanil (**Tabelle 3-4**):

Tabelle 3-3: Auswertung der einzelnen Kalibratoren für Proguanil nach David

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
PG	3,97	3,55	4,12	3,19	2,05	2,73	4,15
$g_u - g_o$	2,64-4,13	2,80-4,44	2,80-4,44	2,80-4,44	2,64-4,13	2,51-4,24	2,80-4,44

Tabelle 3-4: Auswertung der einzelnen Kalibratoren für Cycloguanil nach David

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]
PG	3,46	3,41	3,88	2,77	3,54	3,46
$g_u - g_o$	2,64-4,13	2,70-4,23	2,64-4,13	2,05-2,80	2,35-3,74	2,44-4,00

Daraus ergibt sich, dass es sich bei allen Kalibratoren um eine Normalverteilung der Werte handelt.

3.1.4.2 Präzisionsberechnung der Qualitätskontrollen

Die Auswertung der benötigten statistischen Werte können aus den **Tabellen 3-5** und **3-6** entnommen werden.

Tabelle 3-5: Berechnung der statischen Daten der Qualitätskontrollen für Proguanil

	Q1 [ng/ml]	Q2 [ng/ml]	Q3 [ng/ml]
\bar{x}	0,81	91,01	2500,39
S	0,15	14,77	216,23
Vk	18,33	16,23	8,65

Tabelle 3-6: Berechnung der statistischen Daten der Qualitätskontrollen für Cycloguanil

	Q1 [ng/ml]	Q2 [ng/ml]	Q3 [ng/ml]
\bar{x}	1,55	108,68	2499,44
S	0,20	13,71	1,36
Vk	12,78	12,62	0,05

Anschließend wurde der *David*-Test angewandt und berechnet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse, die in den **Tabellen 3-7** sowie **3-8** dargestellt sind:

Tabelle 3-7: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen für Proguanil nach David

	Q1 [ng/ml]	Q2 [ng/ml]	Q3 [ng/ml]
PG	2,66	3,40	3,72
$g_u - g_o$	2,51 – 4,44	2,51 - 4,44	2,51 – 4,44

Tabelle 3-8: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen für Cycloguanil nach David

	Q1 [ng/ml]	Q2 [ng/ml]	Q3 [ng/ml]
<i>PG</i>	1,92	1,80	1,79
$g_u - g_o$	1,73 – 2,00	1,73 – 2,00	1,73 – 2,00

3.1.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mittels t-Test ermittelt.

Tabelle 3-9: Sollwert-t-Test der Kalibratoren für Proguanil

t- Wert	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
<i>t</i> (b*)	4,25	1,61	3,33	1,9	2,58	2,09	1,06
<i>t</i> (t*)	2,179	2,131	2,131	2,131	2,179	2,228	2,131

(b* = berechnet, t* = tabellarisch)

Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei K1 = 1ng/ml.

Tabelle 3-10: Sollwert-t-Test der Kalibratoren für Cycloguanil

t- Wert	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]
<i>t</i> (b*)	7,79	4,25	2,1	1,07	1,97	1,15
<i>t</i> (t*)	2,179	2,160	2,179	2,571	2,306	2,262

(b* = berechnet, t* = tabellarisch)

Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei $K1 = 1\text{ ng/ml}$ sowie $K2 = 5\text{ ng/ml}$.

Tabelle 28: Sollwert-t-Test der Qualitätskontrollen für Cycloguanil

t- Wert	Q1 [ng/ml]	Q2 [ng/ml]	Q3 [ng/ml]
<i>t</i> (berechnet)	4,758	1,09	0,71
<i>t</i> (tabellarisch)	3,812	3,812	3,812

Bei Q1 ist der berechnete t-Wert größer als der tabellarische Wert. Q2 und Q3 hingegen befinden sich im Vertrauensintervall unter 95%.

3.1.6 Linearität

Die Linearität der Kalibratoren für Proguanil in **Abbildung 3-1** und Cycloguanil in **Abbildung 3-2** wurde anhand der in **Gleichung 2-8** dargestellten Formel bestimmt. Grundlage war die lineare Regression. Das Bestimmtheitsmaß der Geraden (R^2) wurde berechnet:

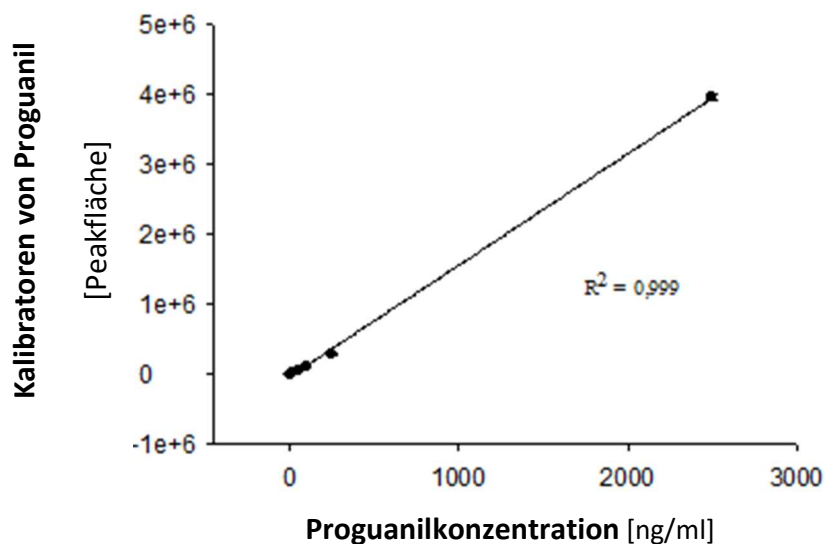


Abbildung 3-1: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Proguanil.

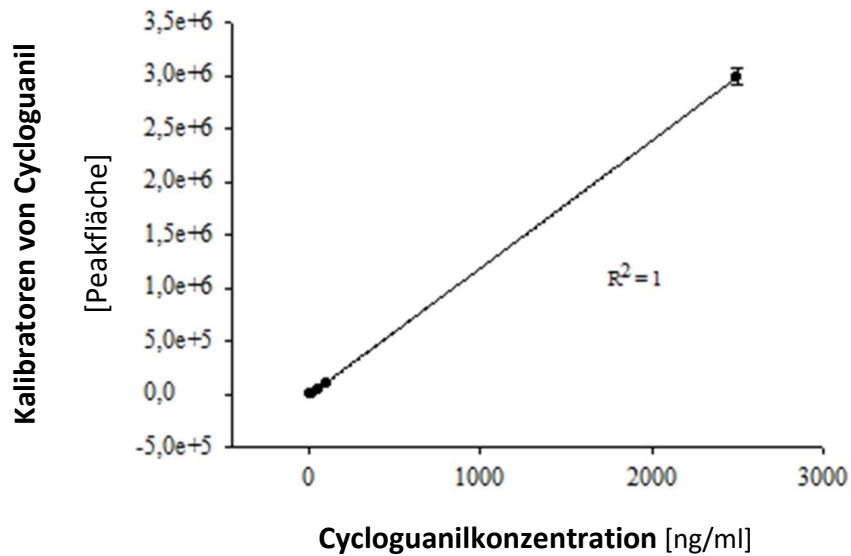


Abbildung 3-2: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Cycloguanil.

Die x-Achsen der Abbildungen 3-1 und 3-2 beschreiben die Kalibratoren mit aufsteigender Konzentration [ng/ml], die y-Achsen geben die Peakflächen für Proguanil und Cycloguanil an.

Die Linearität der Messwerte der Qualitätskontrollen für Proguanil (**Abb. 3-2**) und Cycloguanil (**Abb. 3-3**) wurde identisch zu den Kalibratoren bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) wurde berechnet.

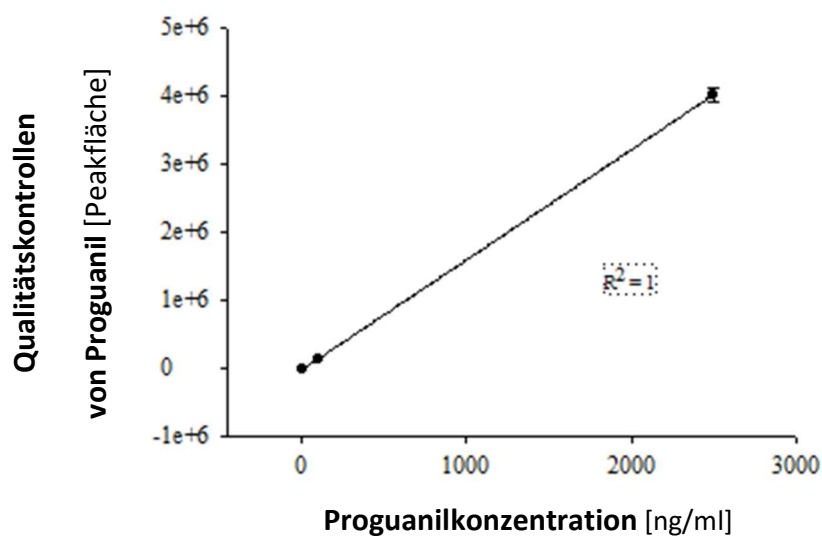


Abbildung 3-3: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Proguanil.

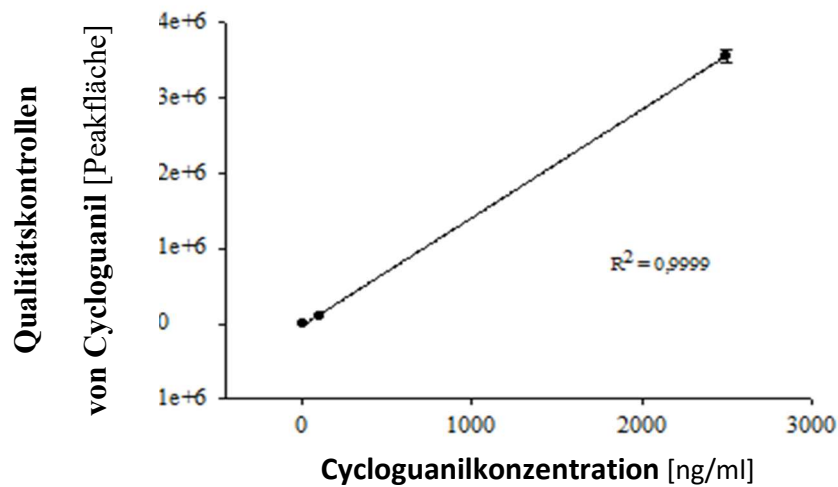


Abbildung 3-4: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Cycloguanil.

Die x-Achse der Abbildungen 3-3 und 3-4 beschreiben die Qualitätskontrollen mit aufsteigender Konzentration [ng/ml], die y-Achse gibt die Peakfläche für Proguanil und Cycloguanil an.

Daraus ergab sich eine Linearität für das Bestimmtheitsmaß der Kalibratoren und der Qualitätskontrollen für beide Arzneistoffe. Sie sind nahe $R^2 = 1$.

3.1.7 Darstellung der Chromatogramme

Die folgenden **Abbildung 3-5** und **Abbildung 3-6** zeigen Chromatogramme der Detektion von Proguanil und Cycloguanil mit 1 ng/ml und dem internen Standard Pyrimethamin 50 ng/ml. Die saubere Trennung der beiden Peaks der Arzneistoffe mit einem zeitlichen Abstand kann hier gezeigt werden. Störpeaks beeinflussen die chromatographische Darstellung nicht. Auch sind keine Überlappungen sowie Zersetzungsprozesse des Analyten zu beobachten (Tailing, Fronting). Daher ist von einer gelungenen Trennung auszugehen.

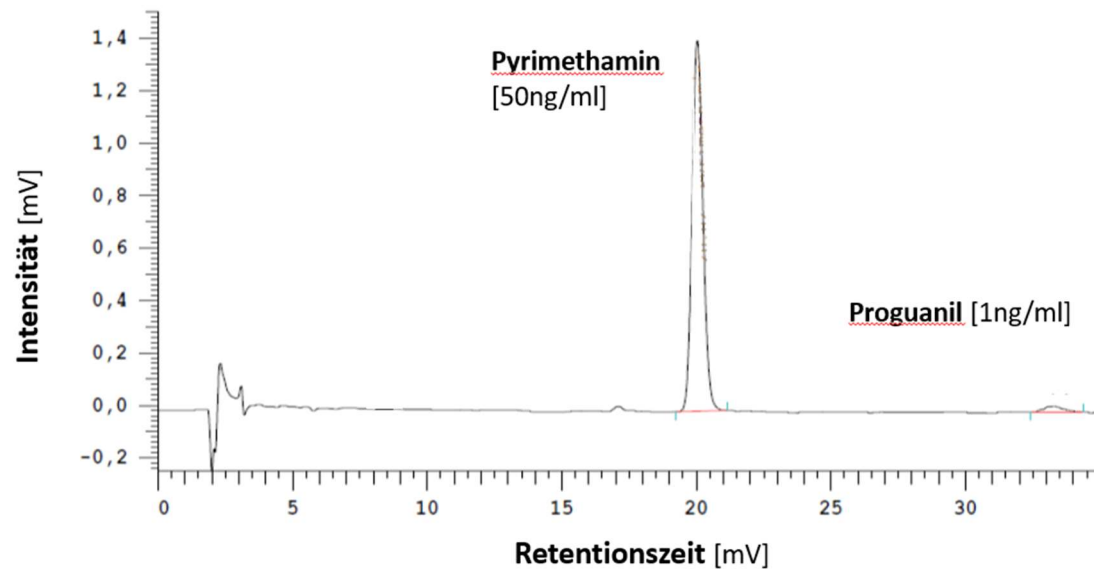


Abbildung 3-5: Chromatographische Darstellung von Proguanil und Pyrimethamin

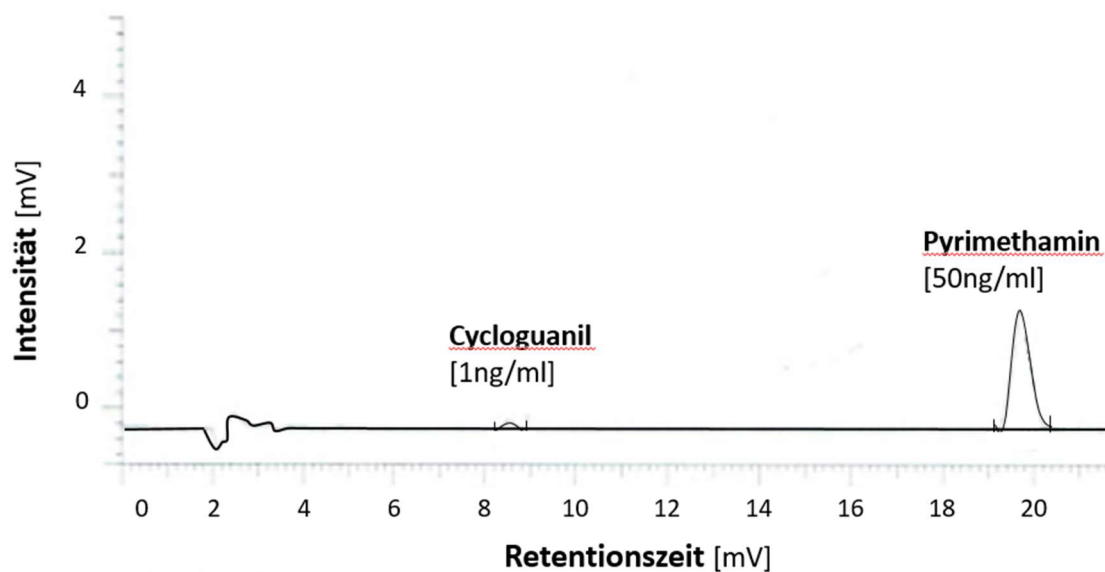


Abbildung 3-6: Chromatographische Darstellung von Cycloguanil und Pyrimethamin

Zellbestandteile, die nach der Lysierung der Zellen und anschließendem Abdampfen mit in die Proben gelangen sind, beeinflussten die Trennung nicht.

3.1.8 Probenvorbereitung

Das Lysat der Zellproben zur Bestimmung von Proguanil und Cycloguanil wurde wie im Versuch mit Amisulprid unter 3.2.7 behandelt und injiziert. Der Unterschied lag in der Zusammensetzung des Lysats, das hier zu 20% mit dem Fließmittel für Proguanil und Cycloguanil versetzt war. Die Qualitätskontrollen wurden wie unter 3.1.3 für den jeweiligen Arzneistoff aufgetaut, die Kalibratoren frisch hergestellt und injiziert.

3.2 Charakterisierung des Transports von Proguanil an OCT-transfizierten HEK293-Zellen

3.2.1 Untersuchung der Permeabilität mit PAMPA-Assay

Der mögliche zelluläre Transport von Proguanil über die organischen Kationentransporter wurde zunächst durch die Diffusion der Substanz mithilfe einer künstlichen PAMPA-Membran bei einer Inkubationszeit von 5 Stunden unter Raumtemperatur untersucht (siehe 2.3.1.). Proguanil zeigte eine geringe Permeabilität durch die künstlich erstellte PAMPA-Membran ($P_e = 1,77 \times 10^{-6}$), was darauf hindeutet, dass Proguanil nicht ohne ein Transportsystem zelluläre Membranen überwinden kann (**Abbildung 3-7**). Die Übereinstimmung steht im Zusammenhang mit der Ermittlung der niedrigen Lipophilie von Proguanil. (Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log D_{7,4} = -0,62$ mittels ADMET Predictor™ Software Version 5.0, Simulations Plus Inc., Lancaster, CA, USA).

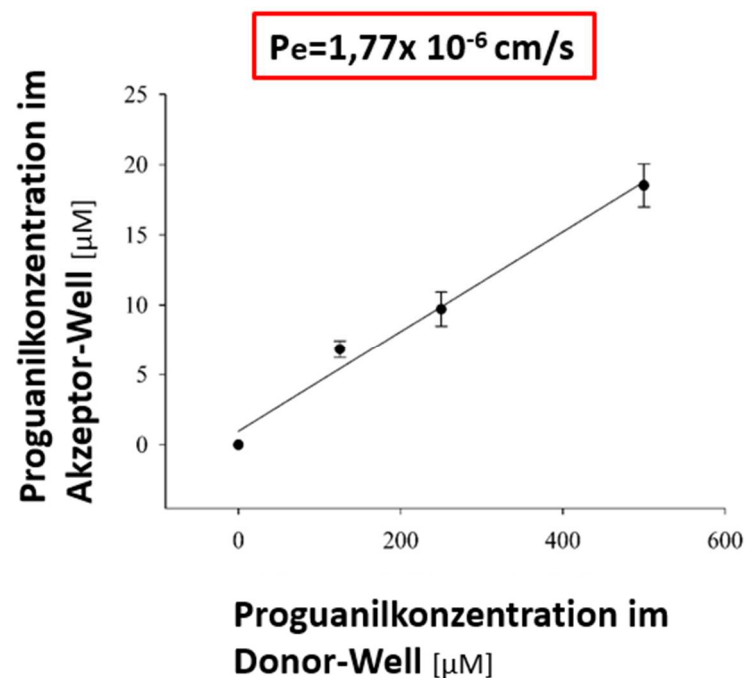


Abbildung 3-7: Bestimmung der Carrier-unabhängigen Membranpermeabilität von Proguanil mittels PAMPA

Dargestellt sind die Membranpermeabilitäten (P_e) von vier Konzentrationen (0, 125, 250, 500 µM). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler drei unabhängiger Versuche.

3.2.2 Direkte Aufnahme von Proguanil an den OCTs der SLC22-Familie

Hierbei wurde die direkte zelluläre Aufnahme von Proguanil an mit OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, oder OCTN2 transfizierten HEK293-Zellen gemessen. Zusätzlich wurde die zelluläre Aufnahme mit MPP⁺ und L-Carnitin inhibiert. MPP⁺ ist ein spezifischer Inhibitor für OCT1, OCT2 sowie OCT3, Carnitin ein Inhibitor für OCTN1 und OCTN2. Als Kontrolle wurden die mit Vektor pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen benutzt, die keinen der Transporter besitzen. Als erstes wurden alle Experimente bei einer einzelnen Konzentration von 2 µM Proguanil durchgeführt. Es zeigte sich eine zehnfach höhere zelluläre Aufnahme von Proguanil an OCT1 transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zu den pcDNA5-transfizierten HEK293-Kontrollzellen (**Abbildung 3-8**). Die Inhibition mittels MPP⁺ bewirkte eine Hemmung der zellulären Aufnahme von Proguanil an den

OCT1-Zellen auf 25% des Ausgangswertes ohne MPP⁺. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte sowie die Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen.

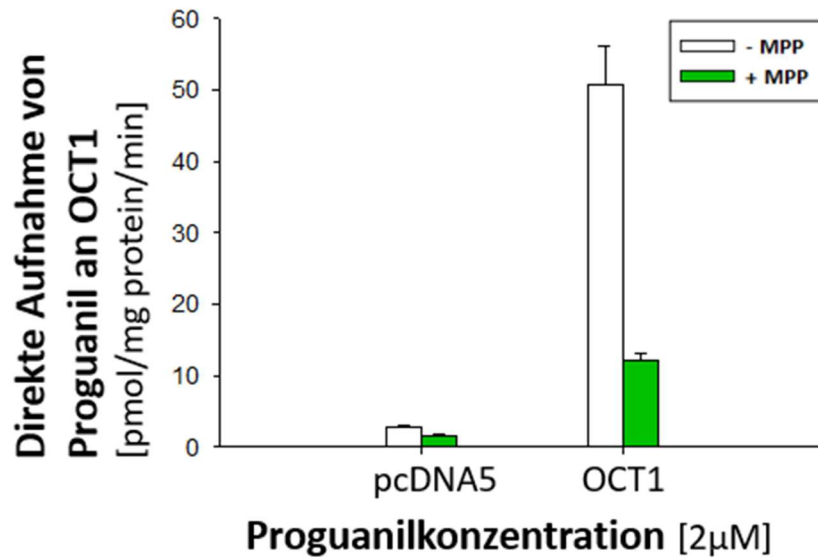


Abbildung 3-8: OCT1-abhängige Aufnahme von Proguanil

OCT überexprimierende (OCT1) und Kontroll- (pcDNA5) HEK293-Zellen wurden mit Proguanil [2 µM] inkubiert [2 Min]. Die Zellen wurden mit (grüne Balken) und ohne (weiße Balken) MPP⁺[1 mM] inkubiert.

An OCT2-transfizierten HEK293-Zellen zeigte sich eine 12-fach höhere zelluläre Aufnahme von Proguanil im Vergleich zu den pcDNA5-Kontrollzellen (**Abbildung 3-9**). Die Inhibition mittels MPP⁺ bewirkte eine Hemmung der zellulären Aufnahme von Proguanil an den OCT2-Zellen auf 8% des Ausgangswertes ohne MPP⁺. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte sowie die Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen.

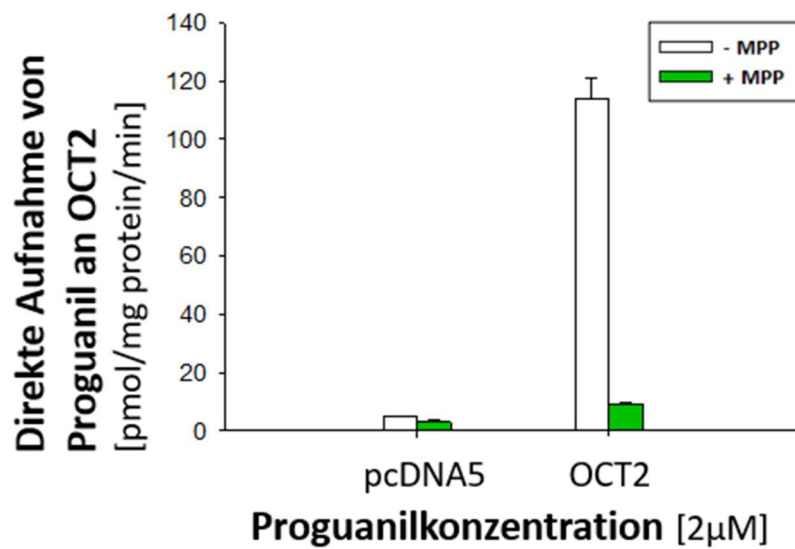


Abbildung 3-9: OCT2-abhängige Aufnahme von Proguanil

OCT überexprimierende (OCT2) und Kontroll- (pcDNA5) HEK293-Zellen wurden mit Proguanil [2 μM] inkubiert [2 Min]. Die Zellen wurden mit (grüne Balken) und ohne (weiße Balken) MPP⁺ [1 mM] inkubiert.

Eine fünffach höhere zelluläre Aufnahme von Proguanil zeigte sich an OCT3-transfizierten im Vergleich zu den pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen (**Abbildung 3-10**). Die Inhibition mittels MPP⁺ bewirkte eine Hemmung der zellulären Aufnahme von Proguanil an den mit OCT3 transfizierten HEK293-Zellen auf 25% des Ausgangswertes. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte sowie die Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen.

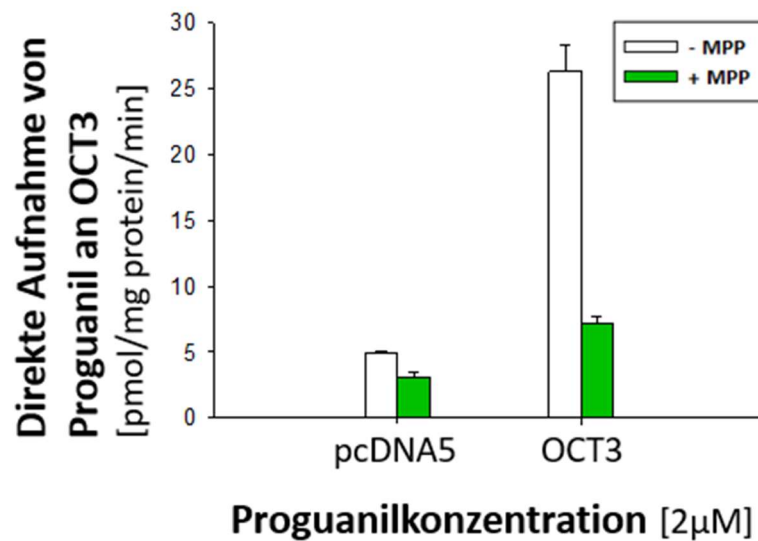


Abbildung 3-10: OCT3-abhängige Aufnahme von Proguanil

OCT überexprimierende (OCT3) und Kontroll-(pcDNA5) HEK293-Zellen wurden mit Proguanil [**2 µM**] inkubiert [**2 Min**]. Die Zellen wurden mit (grüne Balken) und ohne (weiße Balken) MPP⁺ [**1 mM**] inkubiert.

OCTN1 sowie OCTN2 (**Abbildungen 3-11A, 3-11B**) zeigten keine Aufnahme von Proguanil. Die Inhibition fand unter Anwendung des transporterspezifischen Inhibitors L-Carnitin statt. Die Werte sind den pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen gleichzusetzen. Somit zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Transports über OCTN1 und OCTN2 zu den pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen. Daher kann ausgeschlossen werden, dass Proguanil ein Substrat der OCTN1- und OCTN2-Transporter ist.

Anschließend wurde eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT1-, OCT2- sowie OCT3-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt und der Transport bestimmt.

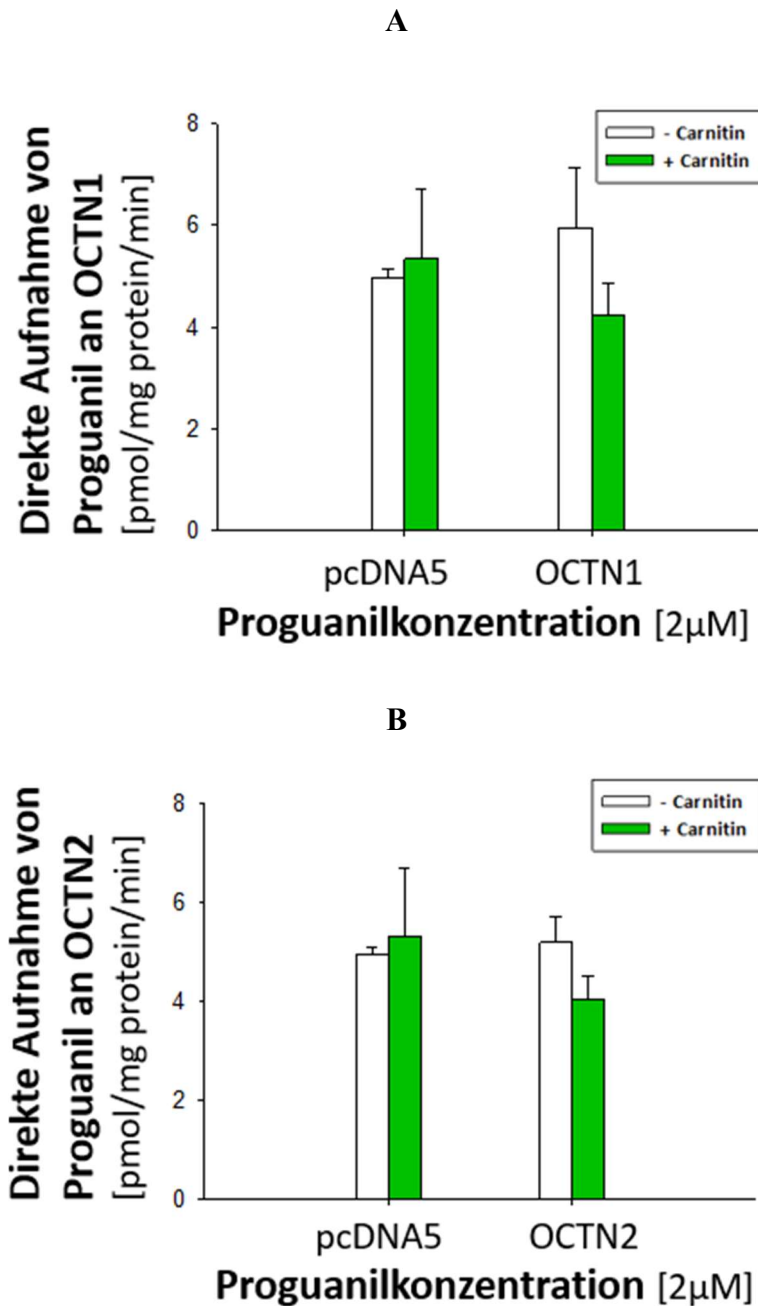


Abbildung 3-11A und B: OCTN1- und OCTN2-abhängige Aufnahme von Proguanil

OCTN1 und OCTN2 überexprimierende und Kontroll- (pcDNA5) HEK293-Zellen wurden mit Proguanil [2 µM] inkubiert [2 Min]. Die Zellen wurden mit (grüne Balken) und ohne (weiße Balken) Carnitin [0,5 mM] inkubiert.

3.2.3 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCTs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Proguanil ein Substrat für OCT1, OCT2 und OCT3 ist, wurden konzentrationsabhängige Versuche der Aufnahme von Proguanil an den OCT1, 2 und 3 durchgeführt. OCTN1 sowie OCTN2 wurden aus der konzentrationsabhängigen Aufnahme ausgeschlossen, da sie Proguanil nicht transportiert haben. Die Inkubationszeit betrug **2 min.**, die Konzentrationen lagen im Bereich **2, 5, 10, 20, 30, 50, 100 und 250 μM .**

3.2.3.1 Die konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT1

Die konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil mittels steigender Arzneistoffkonzentrationen an OCT1 sowie pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Inkubationszeit von 2 Min. zeigte, dass sich eine Sättigung einstellt, wenn beide Kurven (OCT1-transfizierte HEK293-Zellen und pcDNA5-transfizierte HEK293-Zellen) parallel verlaufen (**Abbildung 3-12**). Zur Bestimmung des V_{Max} -und des K_{M} -Wertes und deren Standardfehler wurden die ermittelten Werte der OCT1-, OCT2- und OCT3- transfizierten HEK293-Zellen von den Werten der Zellen von den pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen subtrahiert (**Abbildung. 3-13**).

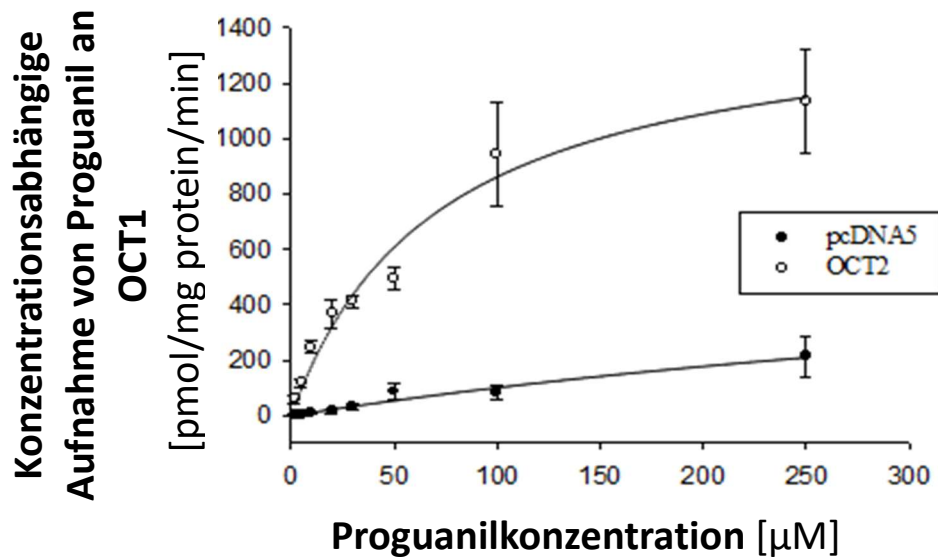


Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT1

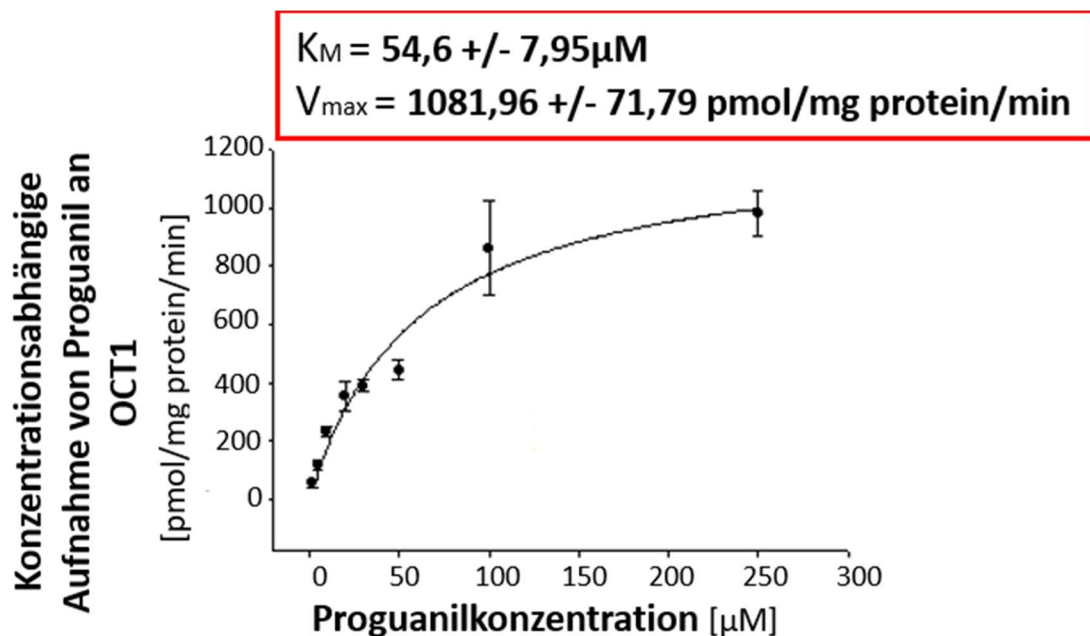


Abbildung 3-13: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT1

Der ermittelte Wert der pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen wurde von dem Wert der OCT2-transfizierten HEK293-Zellen subtrahiert.

OCT1 zeigt eine effektive Aufnahme von Proguanil und eine beginnende Sättigung des Transports (K_M) bei ca. 54,61 μM . Die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{Max}) beträgt 1081,96 pmol/mg Protein/min. Die drei unabhängigen Versuche wurden im Folgenden (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15) als Kurvenschar dargestellt:

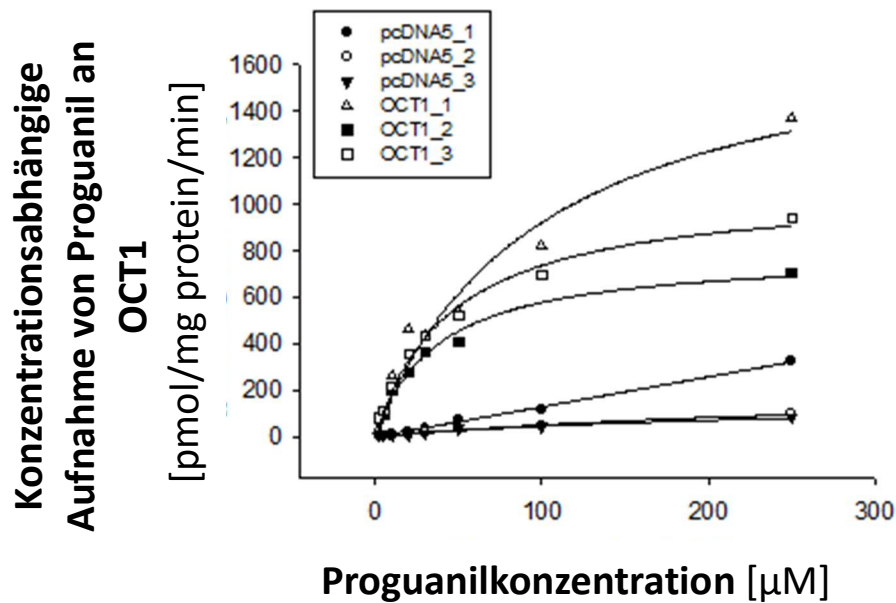


Abbildung 3-14: Kurvenschar dreier unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT1

Proguanil [μM] an OCT1-transfizierten HEK293- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen, Inkubationszeit [2Min].

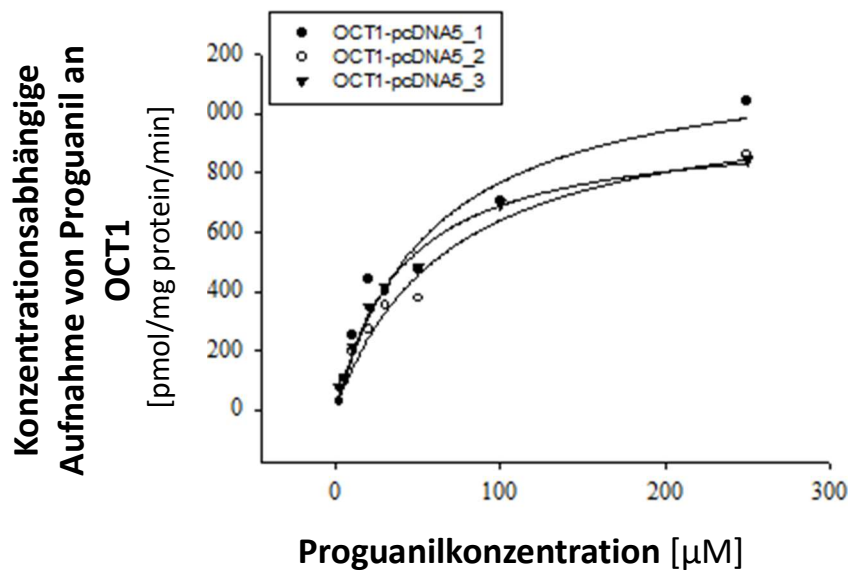


Abbildung 3-15: Kurvenschar drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen an OCT1

Der ermittelte Wert der pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen wurde von dem Wert der OCT1-transfizierten HEK293-Zellen subtrahiert.

3.2.3.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT2

OCT2 zeigt durch einen K_M -Wert von **24,6 µM** eine doppelt so starke Aufnahme von Proguanil als OCT1. Dabei ist die maximale Transportgeschwindigkeit V_{Max} etwa 50% geringer im Vergleich zu OCT1. Die Sättigung des Transports wird 50% schneller erreicht. In **Abbildung 3-16** und **3-17** werden, wie bei OCT1, die einzelnen Versuche anhand von Kurvenschaaren mit OCT2-transfizierten HEK293- dargestellt. Die weiteren statistischen Berechnungen erfolgten wie bei der unter OCT1 beschriebenen Vorgehensweise. Die **Abbildung 3-18** zeigt die Kurvenschar drei voneinander unabhängige Versuche zur konzentrationsabhängigen Aufnahme von Proguanil an OCT2-transfizierten HEK293-Zellen, die **Abbildung 3-19** zeigt die Subtraktion des pcDNA5-Werts vom OCT2-Wert.

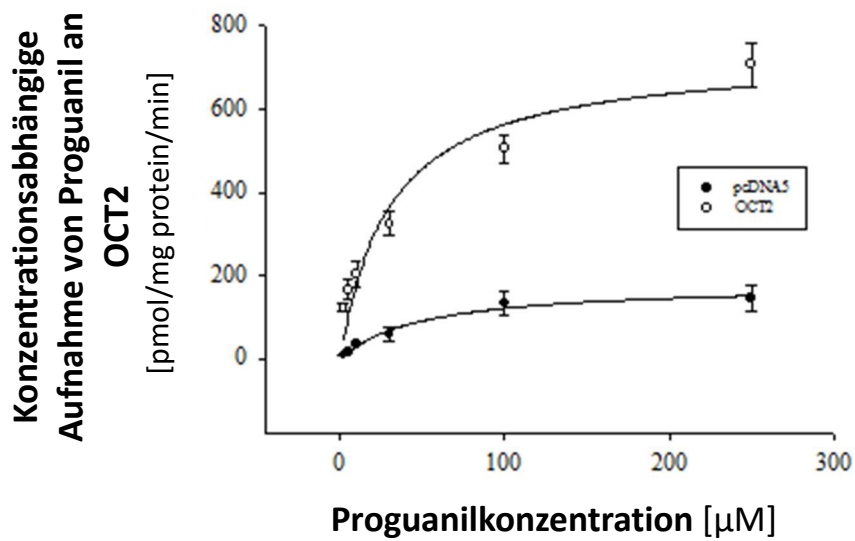


Abbildung 3-16: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil mit aufsteigender Konzentration an OCT2 an OCT2- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen

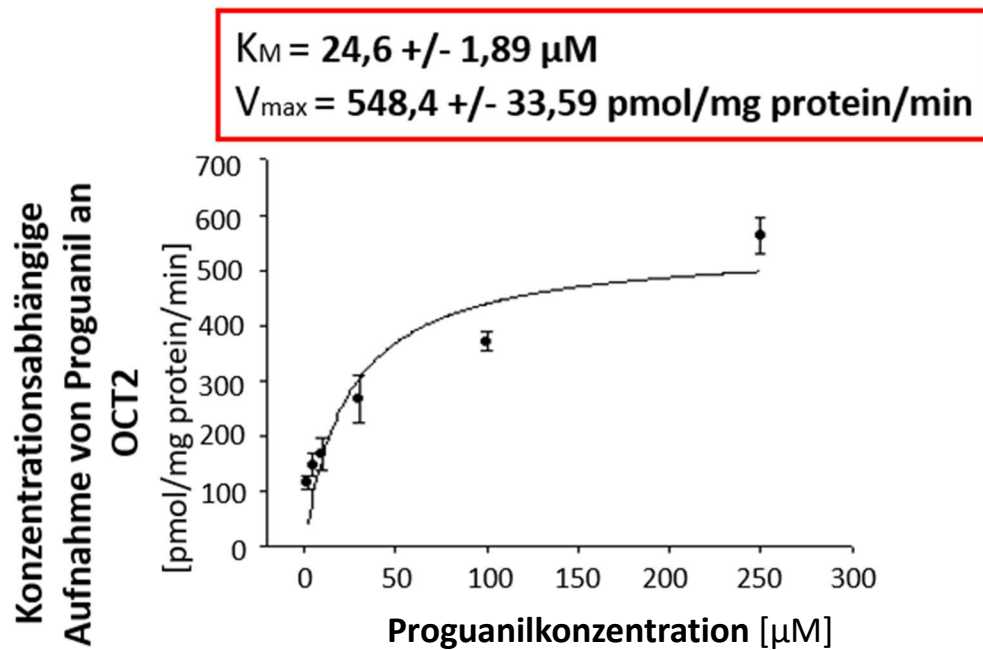


Abbildung 3-17: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT2

Der ermittelte Wert der pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen wurde von dem Wert der OCT2-transfizierten HEK293-Zellen subtrahiert.

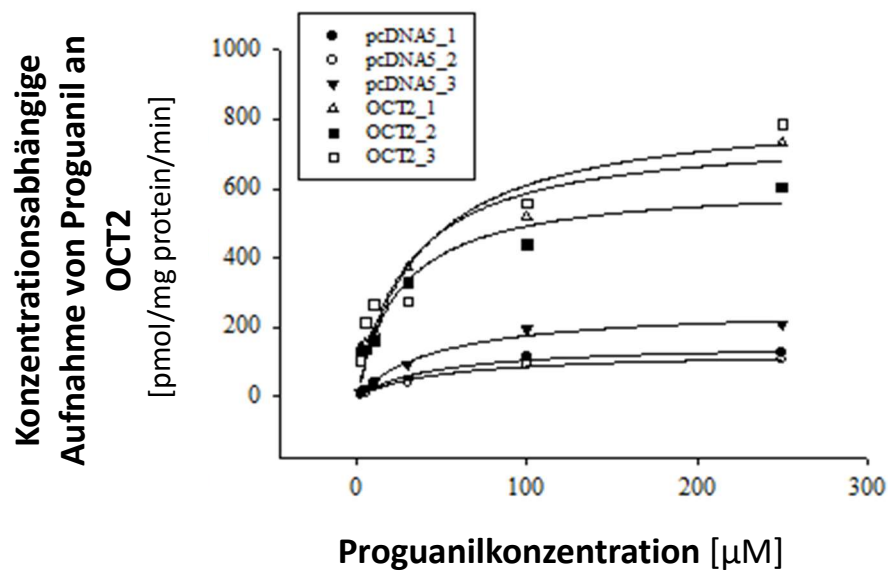


Abbildung 3-18: Kurvenschar drei unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT2-transfizierten HEK293- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen

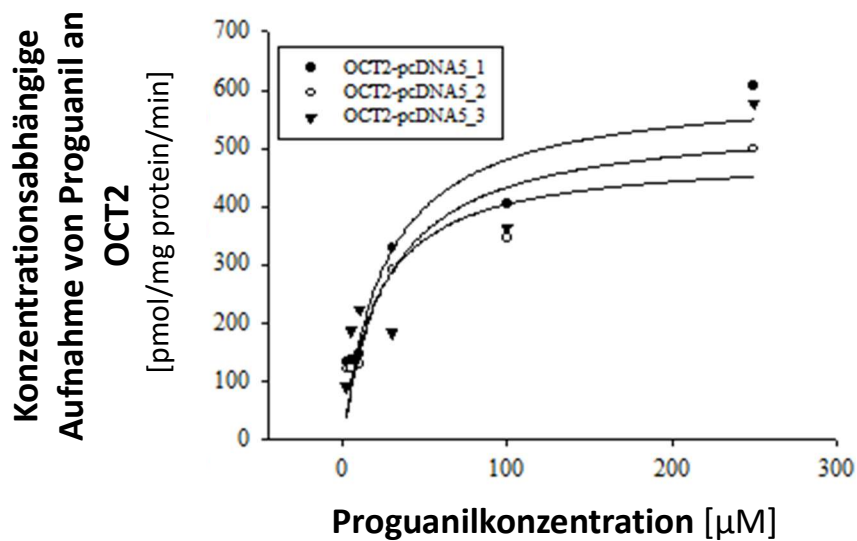


Abbildung 3-19: Kurvenschar der drei durchgeführten Versuche zur konzentrationsabhängigen Aufnahme von Proguanil an OCT2

Dabei wurde der ermittelte Wert der pcDNA5-Zellen von dem OCT1-Wert der HEK293-transfizierten Zellen subtrahiert.

3.2.3.3 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil an OCT3

Die Kurven in **Abbildung 3-20** zeigen den Transport an OCT3 an den mit OCT3 und pcDNA5-transfizierten HEK Zellen. Nach Subtraktion der Werte für pcDNA5-Konzrollzellen von den Werten für OCT3 überexprimierende HEK293-Zellen kann die Sättigung des Transports dargestellt werden (**Abbildung 3-21**).

OCT3 zeigt durch einen K_M -Wert von 55,3 μM eine vergleichbare Aufnahme von Proguanil wie an OCT1. Dabei ist die maximale Transportgeschwindigkeit V_{Max} etwa 50% so hoch wie bei OCT1, die Sättigung des Transports wird 50% schneller erreicht.

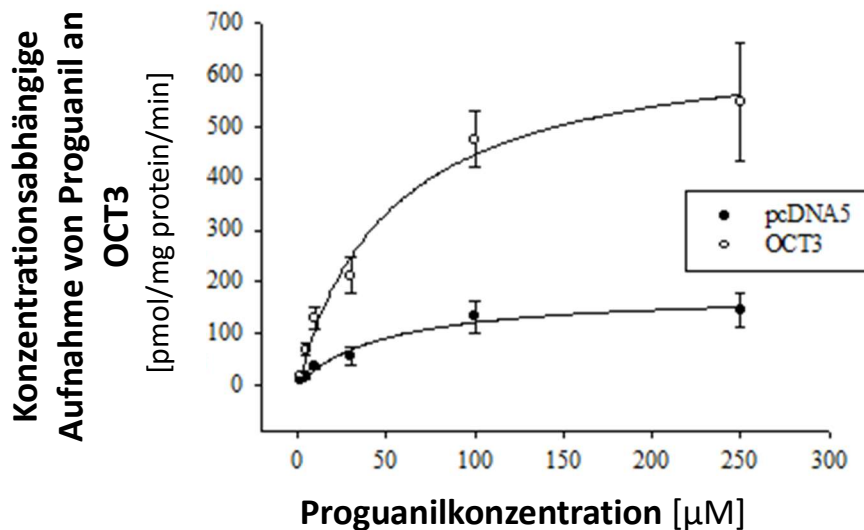


Abbildung 3-20: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT3- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen.

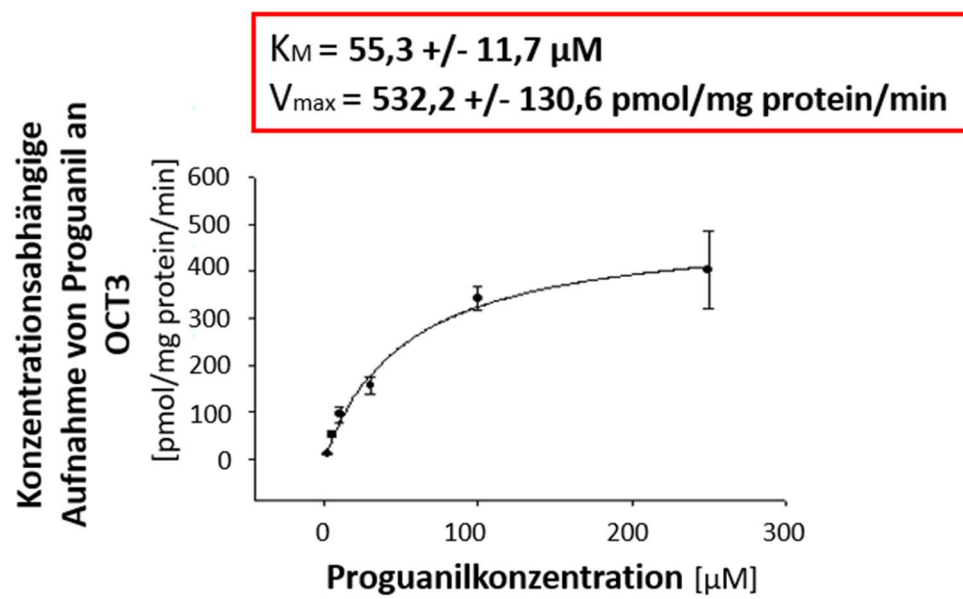


Abbildung 3-21: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in aufsteigender Konzentration an OCT3-transfizierten HEK293- Zellen

Der ermittelte Wert für pcDNA5 wurde vom OCT3-Wert subtrahiert.

Für OCT3 wurden wie bei OCT1 und OCT2 die einzelnen Versuche anhand von Kurvenschaaren im Folgenden (**Abbildung 3-22** und **Abbildung 3-23**) dargestellt:

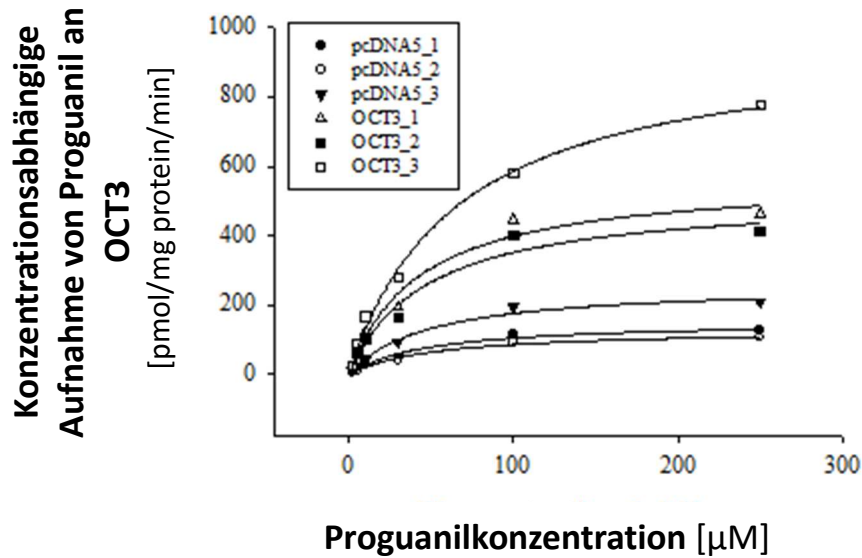


Abbildung 3-22: Kurvenschar drei unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Proguanil an OCT3-transfzierten HEK293-Zellen

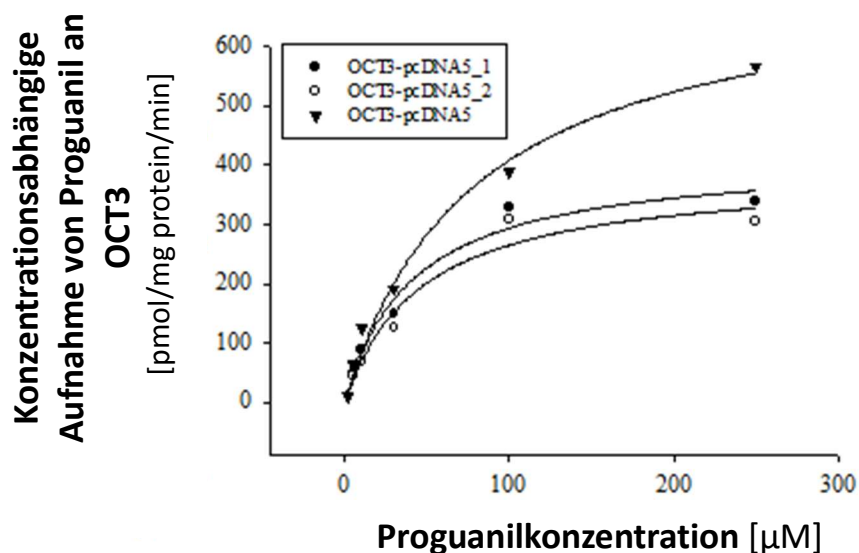


Abbildung 3-23 Kurvenschar drei von Abbildung 3.22 durchgeführten Versuchen

Dabei wurde der ermittelte Wert der pcDNA5-Zellen von dem OCT3-Wert der HEK293-transfzierten Zellen subtrahiert.

Es konnte experimentell dargestellt werden, dass Proguanil ein Substrat für OCT1, OCT2 sowie OCT3 ist. Die **Tabelle 3-14** stellt die Kinetik der Aufnahme von Proguanil der einzelnen OCTs dar:

Tabelle 3-11: Kinetik der Aufnahme von Proguanil einzelner organischer Kationentransporter

Transporter	V_{Max} [pmol/mg Protein/min]		K_M [μ M]		CL_{int} (V_{Max}/K_M)
	MW	SEM	MW	SEM	
OCT1	1082	71,8	54,6	8	19,8
OCT2	548,4	33,6	24,6	1,9	22,3
OCT3	532,2	130,6	55,3	11,7	9,6

(MW=Mittelwert, SEM=Standardfehler)

Die Berechnung des t-Tests zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den K_M -Werten der organischen Kationentransporter 2 und 3, jedoch einen zwischen OCT1 und OCT2 ($p > 0,05$) (SPSS, Turkey-HSD-Test).

OCT1: OCT2 ($p = 0,057$), OCT1: OCT3 ($p = 0,96$) und OCT2: OCT3 ($p = 0,12$).

Proguanil wird von allen drei Transportern transportiert. Die höchste Affinität zu den einzelnen Transportern besitzt es nach den In-vitro-Versuchen in folgender Reihenfolge:

$$OCT2 > OCT1 > OCT3$$

Die Kurvenscharen der einzelnen Versuche für OCT1, OCT2 und OCT3 zeigen die einzelnen Versuche anhand derer die konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil dargestellt werden kann. Dabei wurden drei voneinander unabhängige Versuche miteinander verglichen und der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Standardfehler (SEM) mittels Sigma Plot 12.0 bestimmt. Anschließend wurden für die einzelnen Versuche der V_{Max} - und der K_M -Wert und deren Standardfehler ebenfalls mittels Sigma Plot 12.0 berechnet und graphisch dargestellt.

3.2.4 Effekte der genetischen Polymorphismen von OCT1 auf die Aufnahme von Proguanil

Die zelluläre Aufnahme von Proguanil kann durch den genetischen Polymorphismus an dem OCT1-Transporterprotein stark beeinflusst werden. Die sechs bedeutendsten Polymorphismen wurden auf die Aufnahme analysiert. Bei diesem Versuch zeigte sich die Annahme, dass der Austausch oder die Deletion von Aminosäuren in der Aminosäuresequenz des OCT1-Transporterproteins zu einer Veränderung der zellulären Aufnahme von Proguanil führt. Die Reduzierung der zellulären Aufnahme ist die Folge bei allen Veränderungen der Aminosäuresequenz (**Abbildung 3-24**).

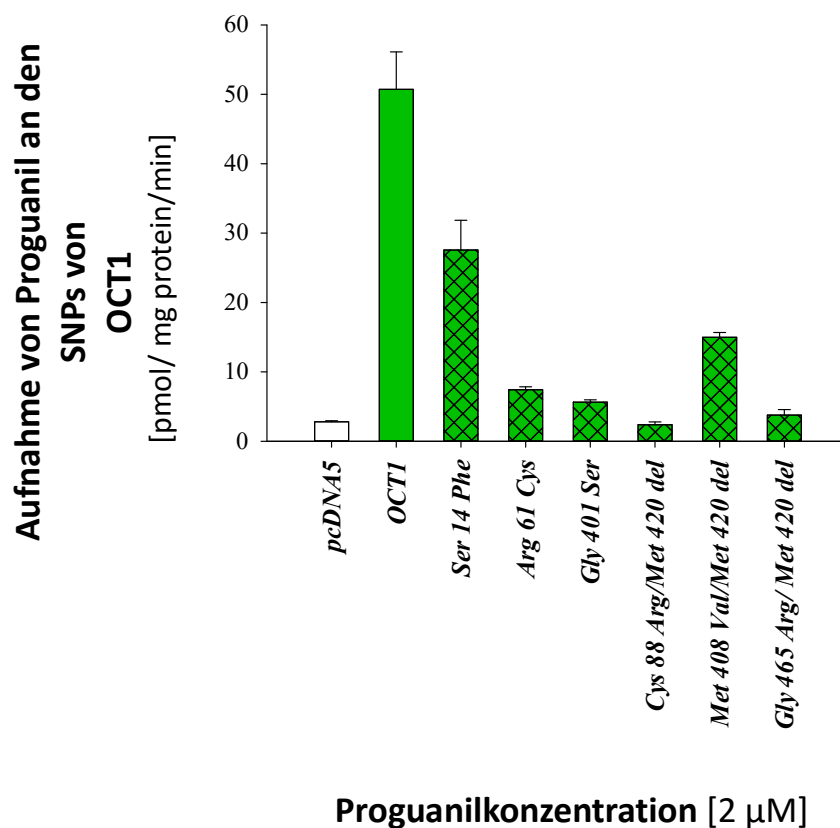


Abbildung 3-24: Effekt der genetischen Polymorphismen am OCT1-Transporterprotein

Es zeigt sich, dass alle Polymorphismen zu einer Reduzierung der Aufnahme von Proguanil führen. Der Polymorphismus an Position 14 (Ser14Phe), bedingt durch den Aus-

tausch von Serin durch Phenylalanin, führte zu einer Reduzierung auf ca. 70%, der Polymorphismus an Position 408 (Met408Val) durch den Austausch von Methionin durch Valin und der Deletion an Position 420 von Methionin zu einer Reduzierung auf 27% des Ausgangswertes für die Aufnahme von Proguanil durch den wildtype des OCT1.

Tabelle 3-12: Effekt der SNPs von OCT1 auf die Aufnahme von Proguanil

<u>SNPs des OCT1-Transporters</u>	<u>Effekt [%] auf die Aufnahme von Proguanil [100%]</u>
Ser14Phe	71,7
Arg61Cys	16,4
Gly401Ser	10,0
Met420del_Cys88Arg	3,1
Met420del_Met408Val	27,3
Met420del_Gly465Arg	4,4

Die **Tabelle 3-15** kann dahingehenden gedeutet werden, dass die Aufnahme von Proguanil durch Polymorphismen des OCT1-Transporters beeinflusst wird. Die SNPs Met420del_Cys88Arg sowie Met420del_Gly465Arg unterscheiden sich nicht von den Werten der pcDNA5-Kontrollzellen. Der stärkste Transport der untersuchten SNPs erfolgt bei Ser14Phe gefolgt von Met420del_Met408Val.

3.2.5 Interaktion der Aufnahme von Proguanil an OCT1 durch Zugabe weiterer Arzneistoffe

Die Feststellung, ob die Aufnahme von Proguanil durch die Anwesenheit weiterer Arzneistoffe beeinflusst wird, die ebenfalls bei einer Malariaerkrankung (**Abbildung 3-25A**) oder verbreiteten Erkrankungen wie Diabetes, Hypertonie oder bei säurebedingten Magen-Darm-Erkrankungen oder zur Unterdrückung der Übelkeit (Ondansetron) verabreicht werden (**Abbildung 3-25B**), wurde im folgenden Versuch durch die gleichzeitige Gabe ihrer 2-, 10-, und 20-fachen maximalen Plasmakonzentration bei einer Inkubationszeit von 2 Minuten analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Untersuchungen. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden aus der Fachliteratur zu den einzelnen Arzneistoffen entnommen. In der folgenden Tabelle sind die maximalen Plasmakonzentrationen der einzelnen Arzneistoffe in Prozent [%] vom Ausgangswert für Proguanil [100%] aufgeführt.

Abb. 3-25A

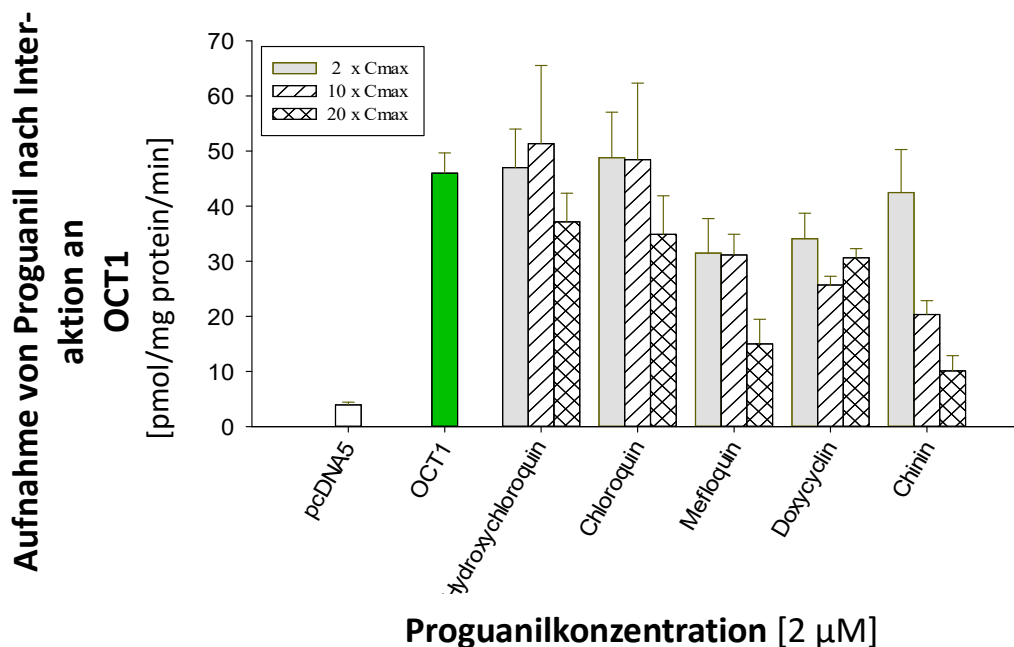
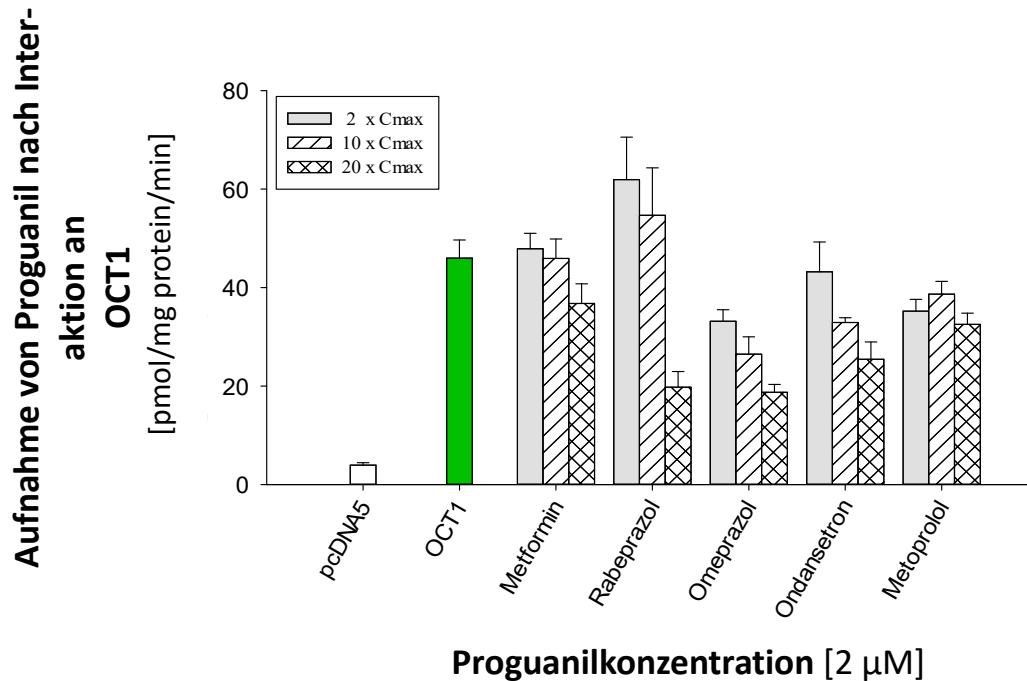


Abb. 3-25B



Proguanil mit Arzneistoffen an OCT1

Interaktion mit der 2- (graue Balken), 10- (gestreifte Balken) und 20-fachen maximalen Konzentration (karierte Balken) einzelner Arzneistoffe an OCT1, Inkubationszeit **[2 min]**. pcDNA5 sowie OCT1 [links] (je grüne Balken) ohne Zugabe eines Arzneistoffs.

Tabelle 3-13: Effekt der einzelnen Arzneistoffe auf die Aufnahme von Proguanil an OCT1.

<u>Arzneistoff</u>	<i>Effekt in Prozent [%] auf die Aufnahme von Proguanil [100%]</i>		
	<u>2x Cmax</u>	<u>10x Cmax</u>	<u>20x Cmax</u>
Hydroxychloroquin	102,2	111,6	80,8
Chloroquin	106,1	105,3	75,9
Mefloquin	68,5	67,7	32,6
Doxycyclin	74,1	55,9	66,6
Chinin	92,4	44,2	22,0
Metformin	104,1	99,8	80,0
Rabeprazol	134,7	118,9	43,0
Omeprazol	72,1	57,6	40,7
Ondansetron	94,0	71,6	55,3
Metoprolol	76,6	84,1	70,7

Die stärkste Inhibition bei der 2-fachen maximalen Plasmakonzentration zeigten Doxycyclin, Metoprolol, Omeprazol und Mefloquin absteigend in [%] vom Ausgangswert für Proguanil [100%]. Eine Abnahme von ca. 6-8 % nach gleichzeitiger Gabe der 2-fachen maximalen Konzentration wurde bei Ondansetron und Chinin beobachtet. Ein leicht synergistischer Effekt auf die Aufnahme von Proguanil erfolgte bei Hydroxychloroquin sowie Chloroquin und Metformin, ein starker synergistischer Effekt wurde bei Rabeprazol beobachtet.

Die 10-fache maximale Plasmakonzentration führte bei sechs der zehn angewandten Arzneistoffe zu einer Senkung der Aufnahme von Proguanil. Rabeprazol reduzierte zwar den synergistischen Effekt der vermehrten Aufnahme von Proguanil, jedoch nicht signifikant. Hydroxychloroquin, Chloroquin sowie Metformin führten zu keiner Änderung der Aufnahme an OCT1. Erst die 20-fache maximale Plasmakonzentration führte zu einer Reduzierung der Aufnahme von Proguanil an OCT1. Die stärkste Inhibition führte Chinin herbei. Ondansetron ist bereits als ein Substrat von OCT1 bekannt.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die zelluläre Aufnahme von Proguanil bei gleichzeitiger Gabe von weiteren Arzneistoffen zu Interaktionen führen kann, die die Aufnahme und somit die therapeutische Wirksamkeit beeinflussen.

3.3 Charakterisierung des Transports von Cycloguanil an OCT-transfizierten HEK293-Zellen

3.3.1 PAMPA-Messung von Cycloguanil

Die Bestimmung der Membranpermeabilität von Cycloguanil wurde identisch zu dem Versuch von Proguanil unter 3.4.1 durchgeführt. Dabei ergab sich ein Permeabilitätskoeffizient (P_e) von $P_e = 2,41 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Dies deutet darauf hin, dass Cycloguanil aufgrund seiner schwachen Lipophilie zelluläre Membranen ohne ein Transportsystem nicht überwinden kann (**Abbildung 3-26**). Der über ADMET Predictor™ (siehe 3.4.1) ermittelte **log D_{7,4}-Wert** von **-0,06** ist ein weiteres Indiz dafür, dass Cycloguanil über einen Transportweg die zelluläre Membran überwinden müsste.

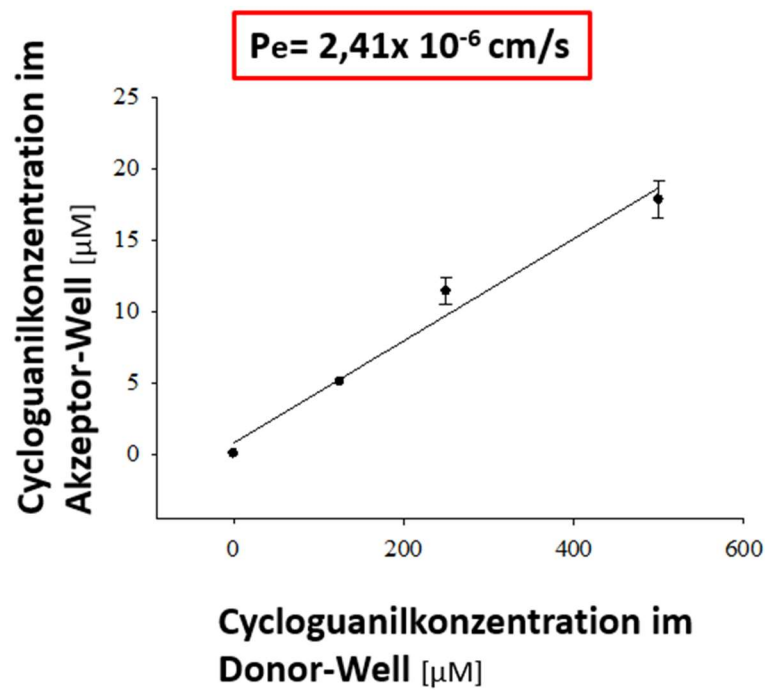


Abbildung 3-26: Bestimmung der Carrier-unabhängigen Membranpermeabilität von Cycloguanil mittels PAMPA

Dargestellt sind die Membranpermeabilitäten (P_e) von vier Konzentrationen (0, 125, 250, 500 µM). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler drei unabhängiger Versuche.

3.3.2 Direkte Aufnahme von Cycloguanil an den OCTs der SLC22-Familie

Die direkte Aufnahme von Cycloguanil wurde wie bereits bei Proguanil beschrieben durchgeführt. Der aktive Metabolit Cycloguanil zeigt bei einer Konzentration von **2 μM** eine 30% höhere zelluläre Aufnahme als die den pcDNA5-transfizierten HEK239-Zellen (Kontrollzellen).

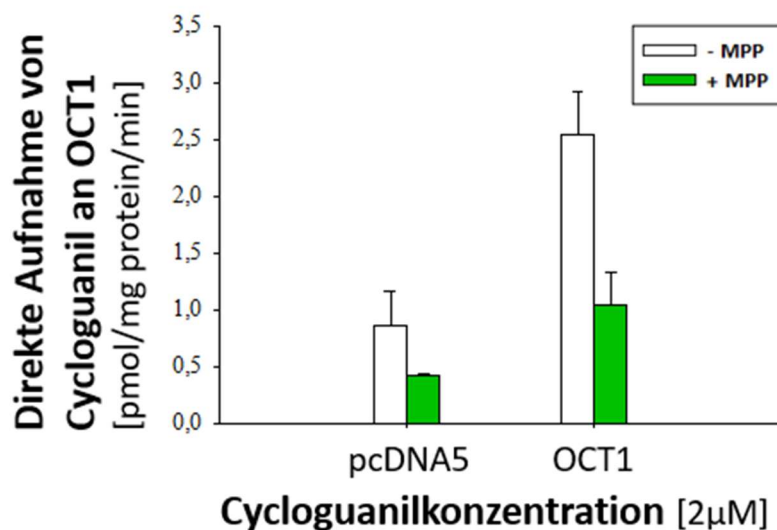


Abbildung 3-27: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an OCT1 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen

OCT1 und pcDNA5 transfizierte HEK-Zellen (weiße Balken), sowie die Hemmung der direkten Aufnahme durch Zugabe von MPP^+ [**1 mM**] an **OCT1** (grüne Balken), Inkubationszeit [**2 Min**].

Die direkte zelluläre Aufnahme wurde ebenfalls wie bei Progaunil mittels MPP^+ gehemmt. Hierbei zeigte sich eine Reduzierung der Aufnahme um 65% des Ausgangswertes an OCT1-überexprimierten HEK293-Zellen (**Abbildung 3-27**). Für die weiteren Versuche zur Aufnahme von Cycloguanil an OCT2 (**Abbildung 3-28**), OCT3 (**Abbildung 3-29**), OCTN1 (**Abbildung 3-30**) und OCTN2 (**Abbildung 3-31**) wurde eine Konzentration von **30 μM** angewandt, um die Effekte am Transporter deutlicher zu erkennen.

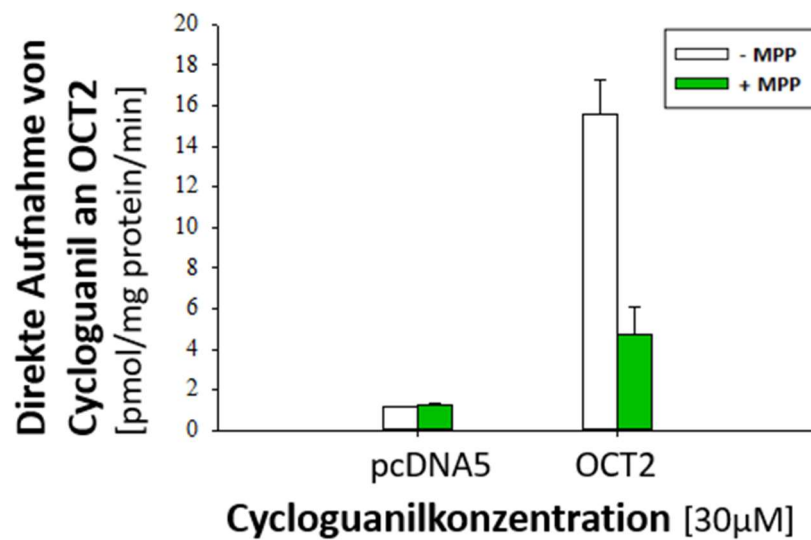


Abbildung 3-28: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCT2 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen

OCT2 und pcDNA5 transfizierte HEK-Zellen (weiße Balken) sowie die Hemmung der direkten Aufnahme durch Zugabe von MPP⁺[1 mM] (grüne Balken), Inkubationszeit [2 Min].

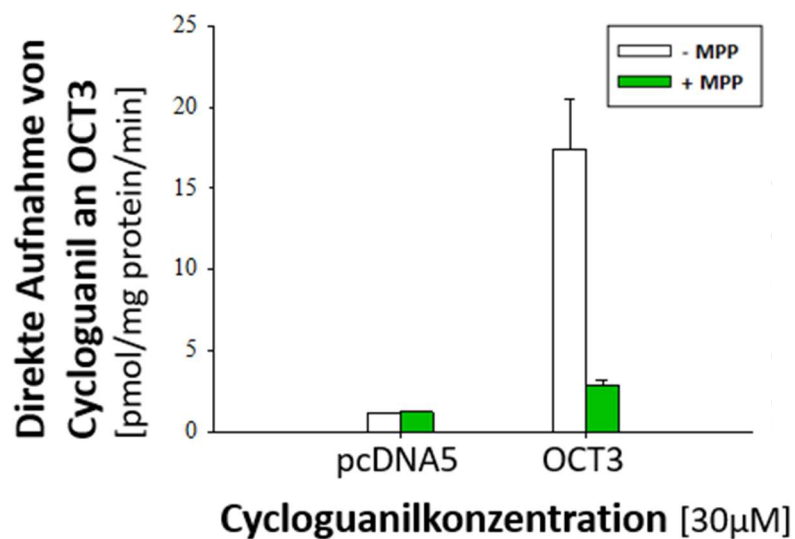


Abbildung 3-29: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCT3 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen.

OCT3 und pcDNA5 transfizierte HEK-Zellen (weiße Balken) sowie die Hemmung der direkten Aufnahme durch Zugabe von MPP⁺[1 mM] (grüne Balken), Inkubationszeit [2 Min].

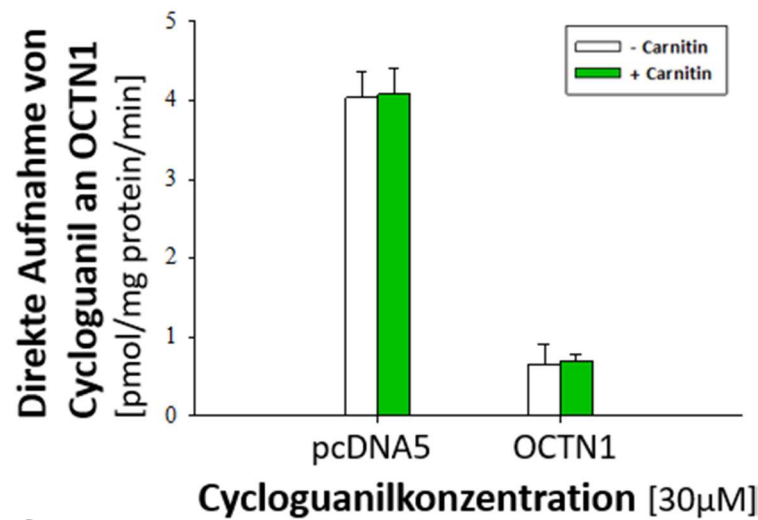


Abbildung 3-30: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCTN1 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen

OCTN1 und pcDNA5 transfizierte HEK-Zellen (weiße Balken) sowie die Hemmung der direkten Aufnahme durch Zugabe von L-Carnitin [0,5 mM] (grüne Balken), Inkubationszeit [2 min.]

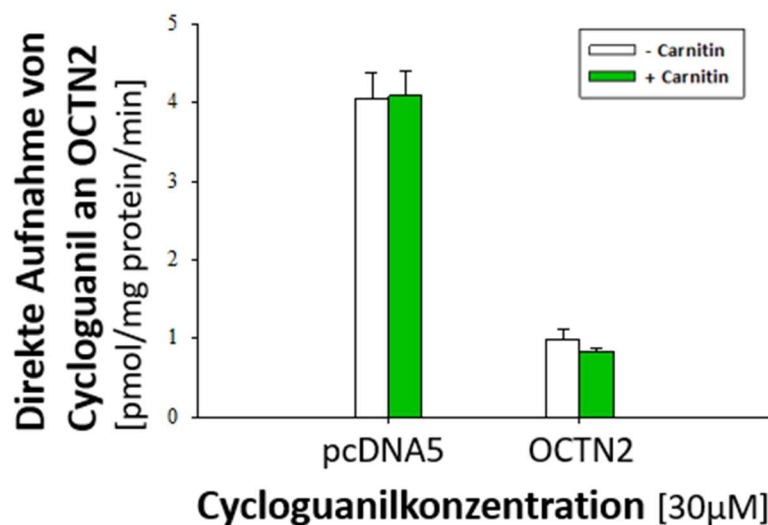


Abbildung 3-31: Die direkte Aufnahme von Cycloguanil an mit OCTN2 und pcDNA5 transfizierten HEK293-Zellen

OCTN2 und pcDNA5 transfizierte HEK-Zellen (weiße Balken) sowie die Hemmung der direkten Aufnahme durch Zugabe von L-Carnitin [0,5 mM] (grüne Balken), Inkubationszeit [2 Min].

Anhand der Versuche der direkten zellulären Aufnahme von Cycloguanil an den OCT-Transportern der SLC22-Familie kann gedeutet werden, dass Cycloguanil über OCT1,

OCT2 und OCT3, aber nicht über OCTN1 und OCTN2 transportiert werden kann. Die stärkste Aufnahme zeigt OCT3, gefolgt von OCT2 und OCT1. Aufgrund der großen Bedeutung von OCT1, das von allen kationischen Transportern die größte Expression in der Leber aufweist, wurde an diesem Transporter anschließend eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil durchgeführt. Der Versuch sollte Aufschluss über eine mögliche Sättigung geben.

3.3.3 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil an OCT1

Die konzentrationsabhängige zelluläre Aufnahme von Cycloguanil an OCT1- sowie pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen bei einer Inkubationszeit von 2 Minuten zeigte, dass sich eine Sättigung einstellt, wenn beide Kurven parallel zueinander verlaufen (**Abbildung. 3-32**). Die Darstellung der OCT1-vermittelten Aufnahme von Cycloguanil erfolgte durch die Subtraktion der Werte der pcDNA5-Kontrollzellen von denen der OCT1 überexprimierten HEK293-Zellen (**Abbildung 3-33**).

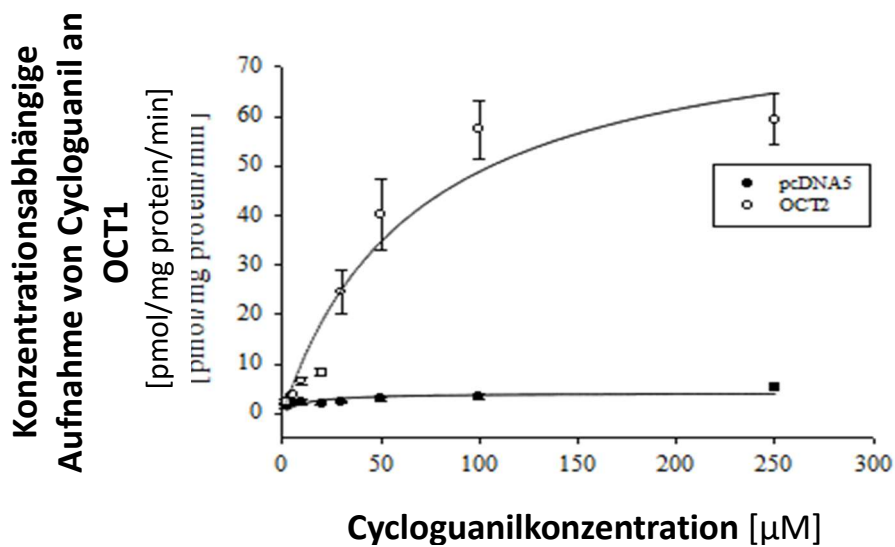


Abbildung 3-32: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil an OCT1- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen

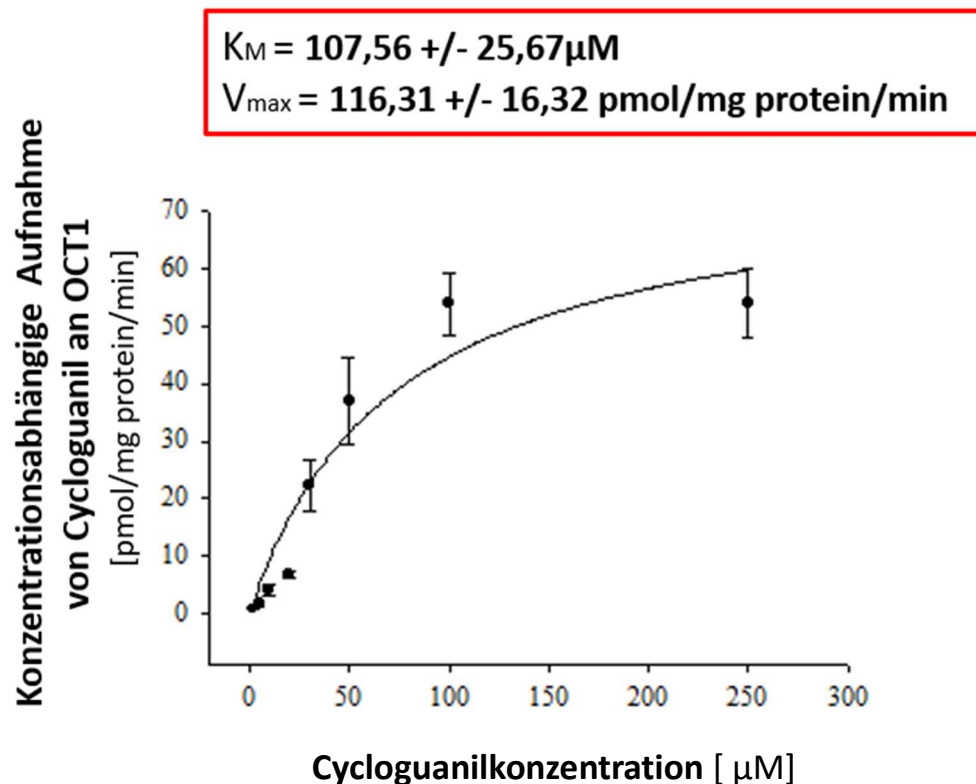


Abbildung 3-33: Konzentrationsabhängige Aufnahme von Cycloguanil in aufsteigender Konzentration an OCT1-transfizierten HEK293- Zellen

Der ermittelte Wert für pcDNA5 wurde vom OCT3-Wert subtrahiert.

Eine Sättigung stellte sich ab einer Konzentration von $107,56 \mu\text{M} \pm 25,67 \mu\text{M}$ ein. Daraus kann geschlossen werden, dass der Transport von Cycloguanil am OCT1-Transporter sättigbar ist. Die maximale Transportgeschwindigkeit am Transporter OCT1 beträgt $116,31 \pm 16,32 \text{ pmol/mg Protein/min}$. Die ermittelten Werte zu den Graphen in **Abbildungen 3-32** und **Abbildung 3-33** der konzentrationsabhängigen Aufnahme von Cycloguanil an OCT1-transfizierten HEK293-Zellen stellen die berechneten Mittelwerte sowie die Standardfehler aus vier unabhängigen Versuchen dar. Die einzelnen Versuche sind in **Abbildung 3-34** sowie **Abbildung 3-35** dargestellt.

Nach der Darstellung des Transports von Cycloguanil an OCT1 und der Sättigbarkeit des Transports wurde der Effekt des genetischen Polymorphismus von OCT1 auf die Aufnahme von Cycloguanil ermittelt. Dabei wurden die SNPs analog zu dem Versuch mit Proguanil genutzt.

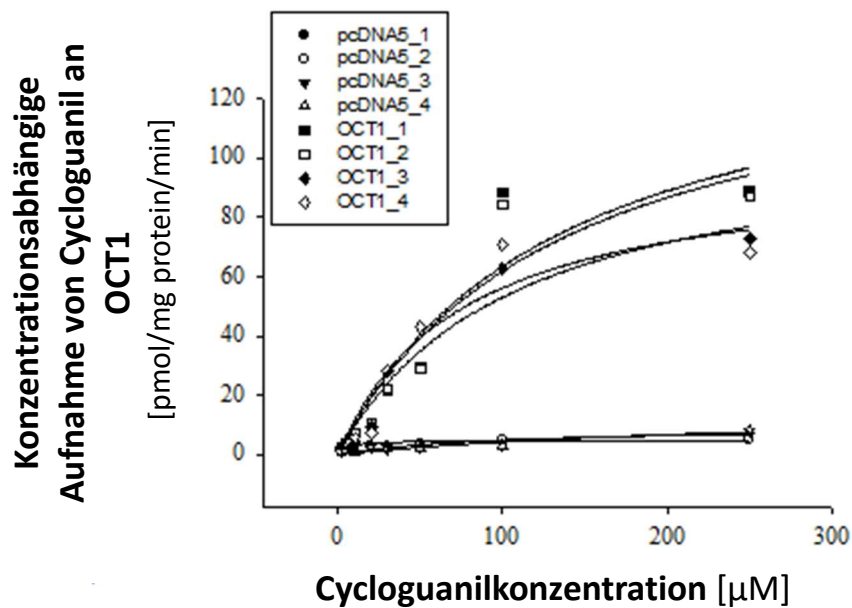


Abbildung 3-34: Kurvenschar vier unabhängiger Versuche des konzentrationsabhängigen Transports von Cycloguanil an OCT1- und pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen

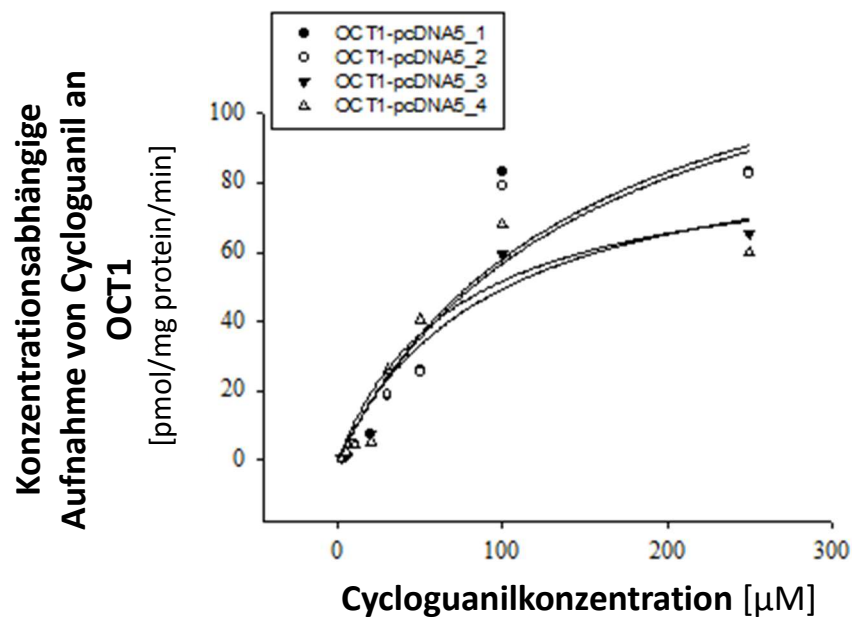


Abbildung 3-35: Kurvenschar von vier unabhängig durchgeführten Versuchen

Die Werte für pcDNA5 wurden von OCT1 subtrahiert.

3.3.4 Effekt des genetischen Polymorphismus von OCT1 auf die Aufnahme von Cycloguanil

Der Effekt des genetischen Polymorphismus von OCT1 (**Abbildung 3-36**) auf die zelluläre Aufnahme von Cycloguanil wurde anhand der sechs bedeutendsten SNPs der Kaukasier analysiert. Dabei zeigte die zelluläre Aufnahme von Cycloguanil bei einer Konzentration von 30 μM bei den Einzelnukleotid-Polymorphismen des OCT1-Transporters Veränderungen bei allen relevanten SNPs der Kaukasier. Die reduzierte direkte zelluläre Aufnahme von Cycloguanil an den einzelnen relevanten SNPs der Kaukasier ist in der **Tabelle 3-14** in Prozent [%] aufgeführt. Bei diesem Versuch zeigte sich die Annahme, dass es durch einen Austausch oder die Deletion einer Aminosäure in der Aminosäuresequenz des OCT1-Transporterproteins es zu einer Veränderung der zellulären Aufnahme von Cycloguanil führen kann.

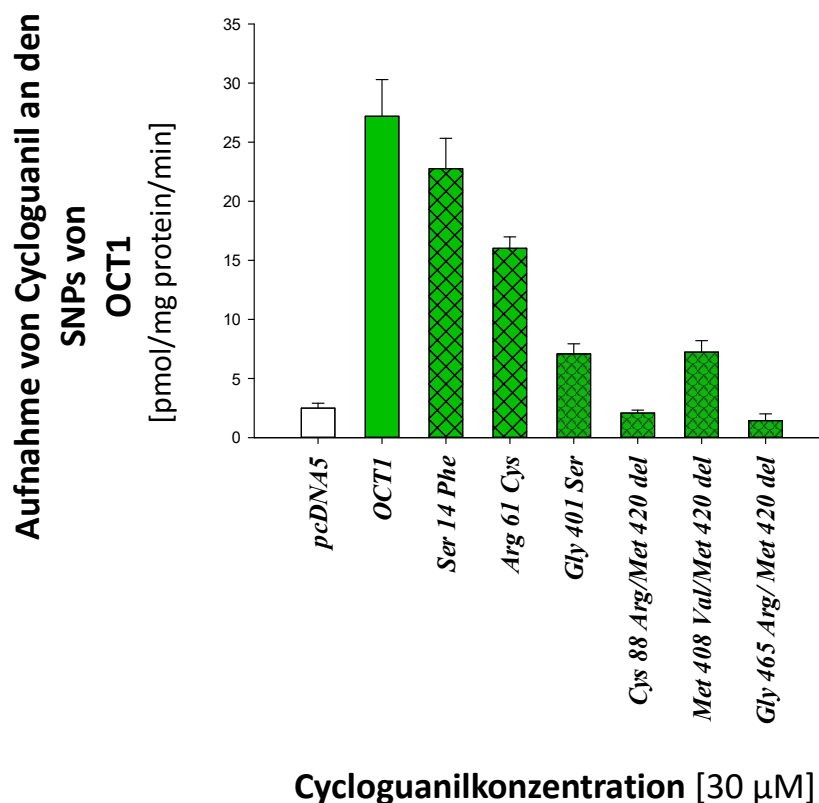


Abbildung 3-36: Effekt der genetischen Polymorphismen am OCT1-Transporterprotein auf die Aufnahme von Cycloguanil

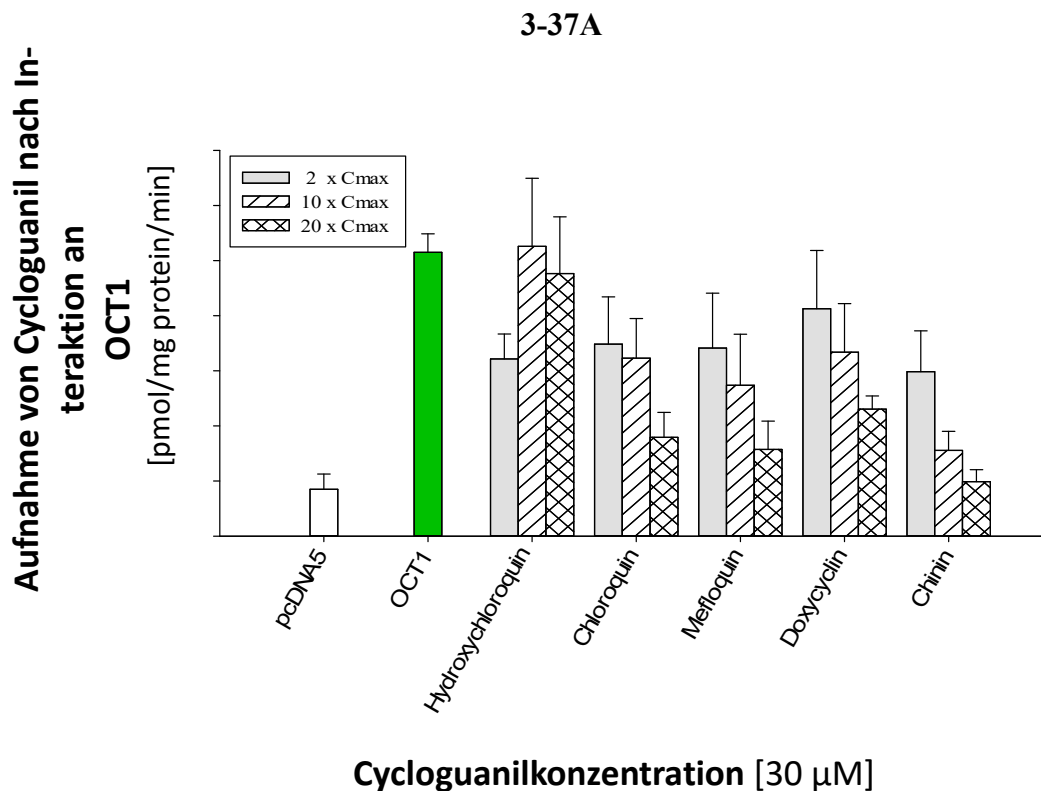
Tabelle 3-14: Effekte der SNPs von OCT1 auf die Aufnahme von Cycloguanil.

<u>SNPs des OCT1-Transporters</u>	<u>Effekt [%] auf die Aufnahme von Cycloguanil [100%]</u>
Ser14Phe	83,7
Arg61Cys	58,9
Gly401Ser	26,0
Met420del_Cys88Arg	7,7
Met420del_Met408Val	26,6
Met420del_Gly465Arg	5,3

Die **Tabelle 3-14** zeigt, dass, wie bei Proguanil, die Aufnahme von Cycloguanil durch Polymorphismen des OCT1-Transporters beeinflusst wird. Die Werte der SNPs von OCT1-transfizierten HEK293-Zellen mit Met420de_Cys88Arg sowie Met420del_Gly465Arg unterscheiden sich unwesentlich von denen der pcDNA5-transfizierten-HEK293-Zellen (Kontrollzellen). Der stärkste Transport der untersuchten SNPs erfolgt bei Ser14Phe mit 83,7%, gefolgt von Arg61Cys mit 58,9%, Met420del_Met408Val mit 26,6%, Gly401Ser mit 26,0% vom Ausgangswert.

3.3.5 Interaktion der Aufnahme von Cycloguanil an OCT1 durch weitere Arzneistoffe

Der Versuch möglicher Effekte bei der gleichzeitigen Zugabe relevanter Arzneistoffe, die ebenfalls bei einer Malariaerkrankung (**Abbildung 3-37A**) oder einer verbreiteten Erkrankung wie Diabetes mellitus, Hypertonie oder einer erhöhten Säureproduktion des Magens (**Abbildung 3-37B**) verabreicht werden können, mit Cycloguanil [30 μ M] wurde identisch zu Proguanil (3.4.5) durchgeführt. Die Effekte aus drei unabhängigen Versuchen unter der Bestimmung der Mittelwerte und Standardfehler sind im Folgenden (**Abbildung 3-37A** und **Abbildung 3-37B**) dargestellt. **Tabelle 3-15** verdeutlicht den Effekt der 2-, 10- sowie 20-fachen maximalen Plasmakonzentration der einzelnen Arzneistoffe in Prozent [%] vom Ausgangswert der Aufnahme von Cycloguanil als Referenz an OCT1 (100%).



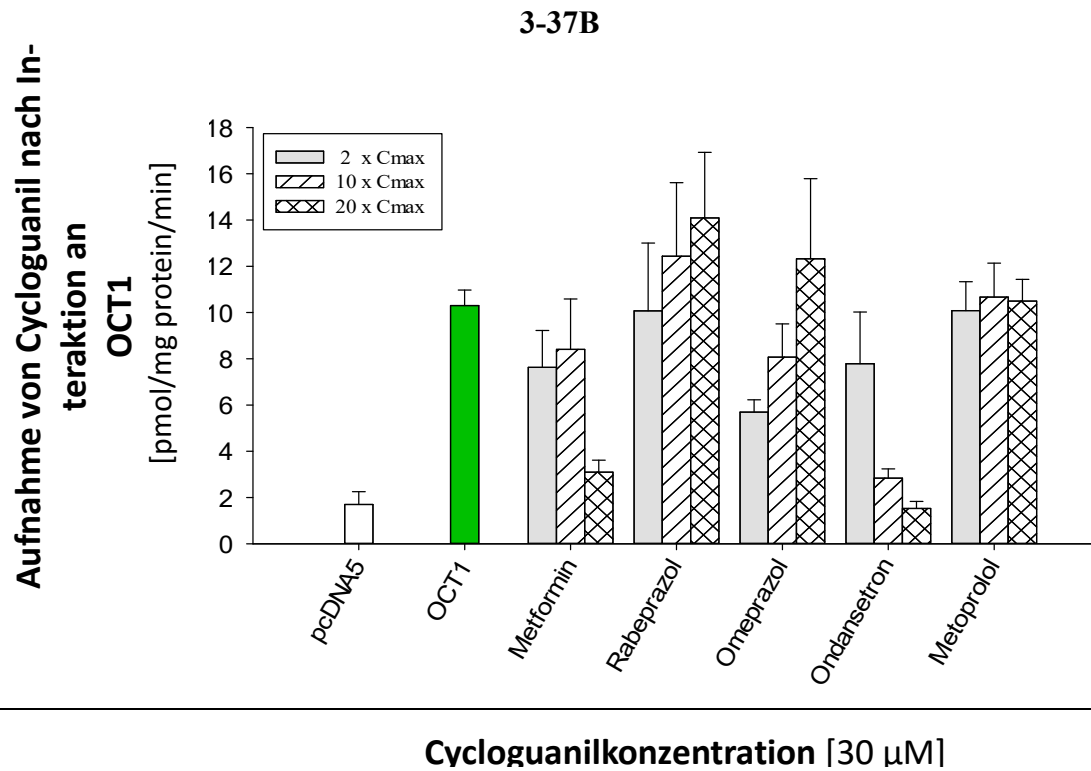


Abbildung 3-37A und B: Interaktion von Cycloguanil mit Arzneistoffe an OCT1

Interaktion mit der 2- (graue Balken), 10- (gestreifte Balken) und 20-fachen maximalen Konzentration (karierte Balken) einzelner Arzneistoffe an OCT1, Inkubationszeit **[2 min]**, pcDNA5 sowie OCT1 [links] (je grüne Balken) ohne Zugabe eines Arzneistoffs.

Der Effekt der einzelnen Pharmaka wird in der **Tabelle 3-15** nochmals zusammengefasst:

Tabelle 3-15: Effekt der einzelnen Arzneistoffe auf die Aufnahme von Cycloguanil an OCT1.

<u>Arzneistoff</u>	<i>Effekt in Prozent [%] auf die Aufnahme von Cycloguanil [100%]</i>		
	<u>2x Cmax</u>	<u>10x Cmax</u>	<u>20x Cmax</u>
Hydroxychloroquin	62,4	102,1	92,5
Chloroquin	67,6	62,7	34,8
Mefloquin	66,3	53,1	30,6
Doxycyclin	80,1	64,8	44,8
Chinin	58,0	30,2	19,2
Metformin	74,0	81,6	30,1
Rabeprazol	97,8	120,7	136,8
Omeprazol	55,2	78,3	119,6
Ondansetron	75,6	27,6	14,8
Metoprolol	97,9	103,6	101,9

Die stärkste Inhibition nach Zugabe der 2-fachen maximalen Plasmakonzentration zeigten Omeprazol mit 55,2% gefolgt von Chinin mit 58% vom Ausgangswert für Cycloguanil (100%). Eine geringfügige Reduzierung der Aufnahme nach Zugabe der 2-fachen maximalen Plasmakonzentration von Cycloguanil erfolgte bei gleichzeitige Gabe von Metoprolol und Rabeprazol. Ein leicht synergistischer Effekt auf die Aufnahme von Cycloguanil erfolgte bei gleichzeitiger Gabe von Hydroxychloroquin bei Zugabe der 10-fachen maximalen Plasmakonzentration, bei Rabeprazol ab der 10- sowie 20-fachen maximalen Plasmakonzentration. Die gleichzeitige Gabe von Metoprolol zu Cycloguanil

zeigte keinen Einfluss nach der 2-, 10- und 20-fachen Zugabe seiner maximalen Plasmakonzentration. Fünf der zehn Arzneistoffe zeigten bei aufsteigender Zugabe ihrer maximalen Plasmakonzentrationen eine Inhibition der Aufnahme von Cycloguanil. Ondansetron, ein Substrat des OCT1-Transporters, zeigte bei der Zugabe der 20-fachen maximalen Plasmakonzentration die größte Inhibition (14,8% vom Ausgangswert 100%). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die zelluläre Aufnahme von Cycloguanil bei gleichzeitiger Gabe von weiteren Arzneistoffen zu Interaktionen am Transporter führen kann, die die Aufnahme und somit die therapeutische Wirksamkeit beeinflussen.

3.4 Charakterisierung des Transports von Proguanil in Erythrozyten

3.4.1 Direkte Aufnahme von Proguanil in die Erythrozyten

Die Aufnahme von Proguanil [2 μM] (**Abbildung 3-38**) und [20 μM] (**Abbildung 3-39**) durch die Erythrozyten wurde anhand der gewonnen Peakflächen beobachtet. Bei 4°C wurde davon ausgegangen, dass es zu keiner Aktivität eines möglichen Kationentransporters kommen konnte. Es zeigte sich bei beiden Konzentrationen, dass eine erythrozytäre Aufnahme des Wirkstoffs stattgefunden hat und durch die Zugabe von MPP⁺ [1 mM] gehemmt werden kann. MPP⁺ ist ein Substrat der OCT1, OCT2 und OCT3.

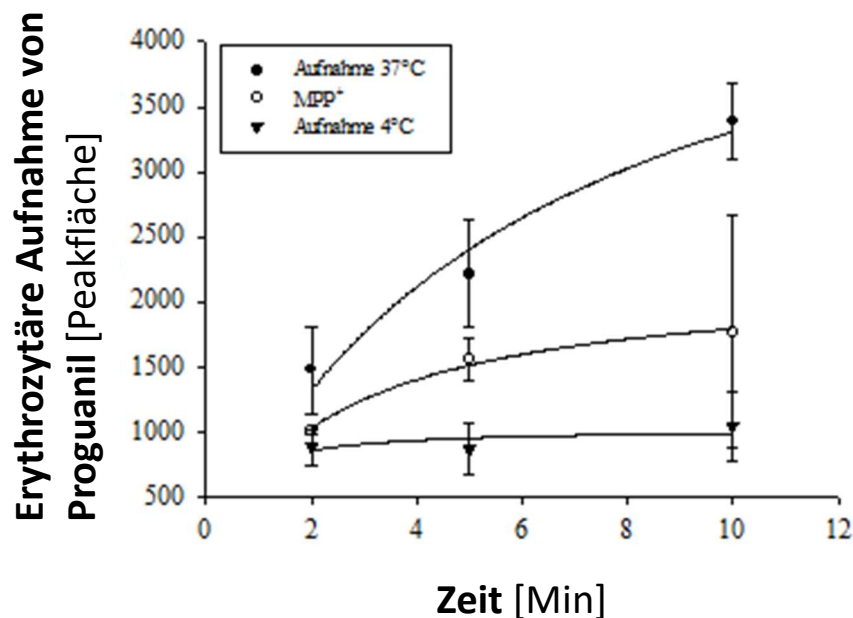


Abbildung 3-38: Direkte sowie inhibierte erythrozytäre Aufnahme von Proguanil

Proguanil [2 μM] bei einer Inkubationszeit [2, 5, 10 Min].

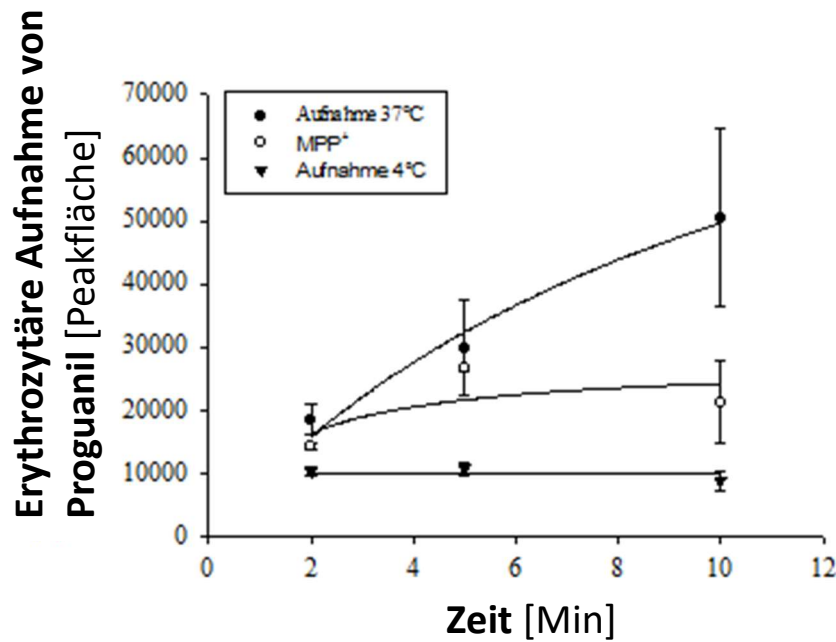


Abbildung 3-39: Direkte und inhibierte erythrozytäre Aufnahme von Proguanil

Proguanil [20 μM] bei einer Inkubationszeit von [2, 5, 10 Min].

Die **Abbildung 3-38** und **Abbildung 3-39** zeigen, dass eine zeitlich steigende erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei 37°C stattfindet. Die gleichzeitige Gabe von MPP⁺ bei 37°C führt zu einer Hemmung der erythrozytären Aufnahme von Proguanil. Im Vergleich dazu zeigen die bei 4°C inkubierten Erythrozyten wie vorhergesehen keine Aufnahme von Proguanil. Daraus kann geschlossen werden, dass Proguanil die Erythrozytenmembran überwinden und sich im Zellinneren anreichern kann. Die Inhibition des Transports mittels MPP⁺ lässt die Vermutung zu, dass ein organischer Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3) für die erythrozytäre Aufnahme verantwortlich sein könnte.

3.4.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil in die Erythrozyten

Durch die Messungen der zeitabhängigen Aufnahme von Proguanil unter 3.4.1 wurde die konzentrationsabhängige Aufnahme von Proguanil bei einer Inkubationszeit von 10 Min. gemessen (**Abbildung 3-40**). Dabei wurden die Erythrozyten bei 37°C und 4°C inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Einzelversuche sind in **Abbildung 3-4**) als Kurvenschar dargestellt. Daraus wurden jeweils die K_M - und V_{Max} -Werte sowie deren Standardfehler berechnet.

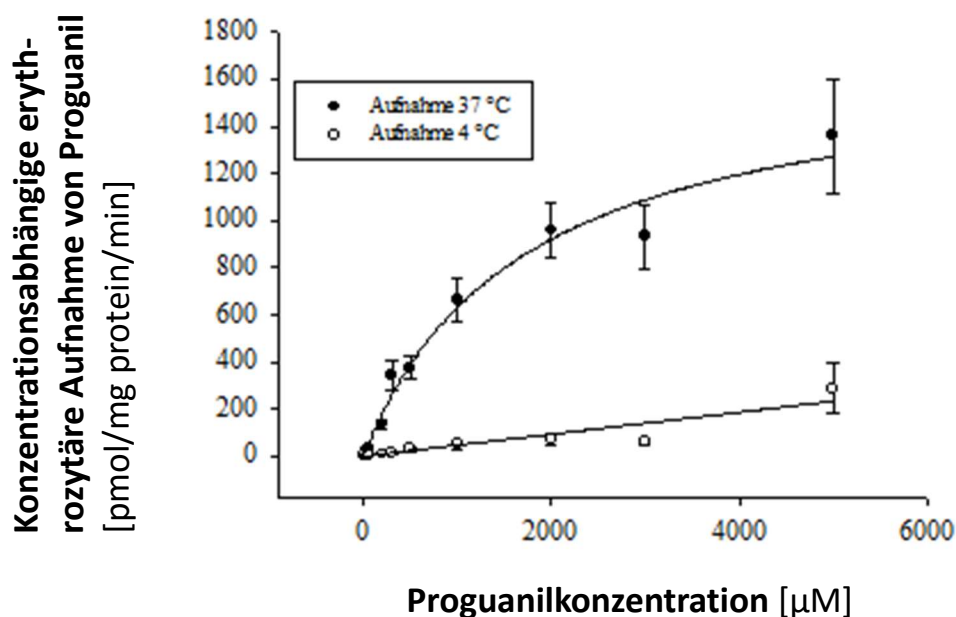


Abbildung 3-40: Konzentrationsabhängige erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei aufsteigender Konzentration bei unterschiedlichen Temperaturen

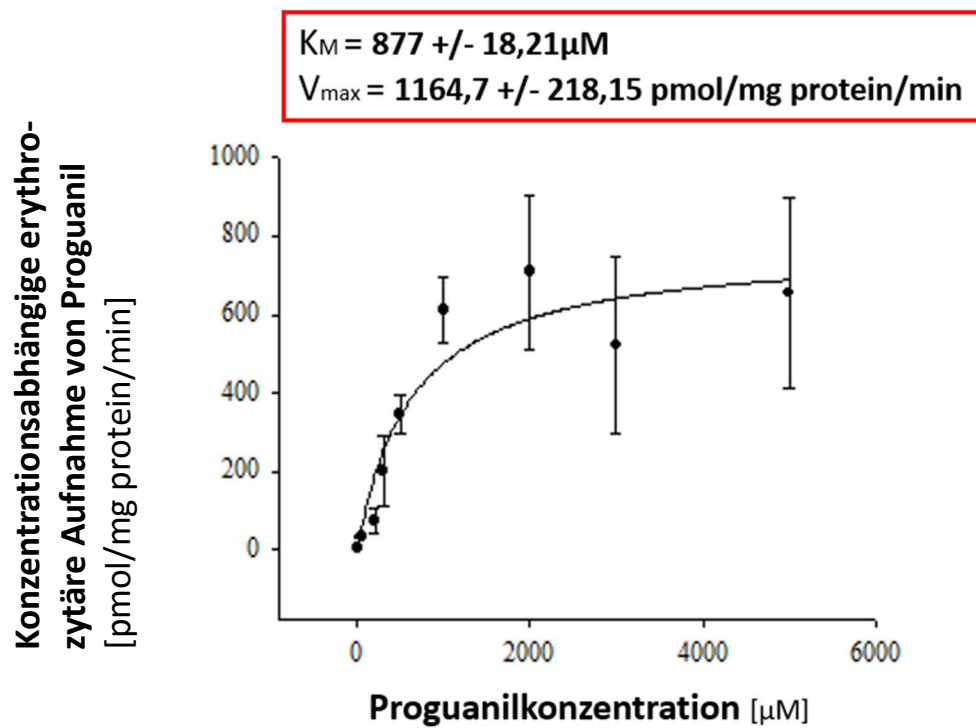


Abbildung 3-41: Konzentrationsabhängige erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei aufsteigender Konzentration

Um die Sättigung bestimmen zu können, werden die Werte für die Aufnahme bei 4°C von den Werten für 37°C subtrahiert. Daraus ergibt sich eine Sättigung der erythrozytären Aufnahme, Inkubationszeit **[10Min]**.

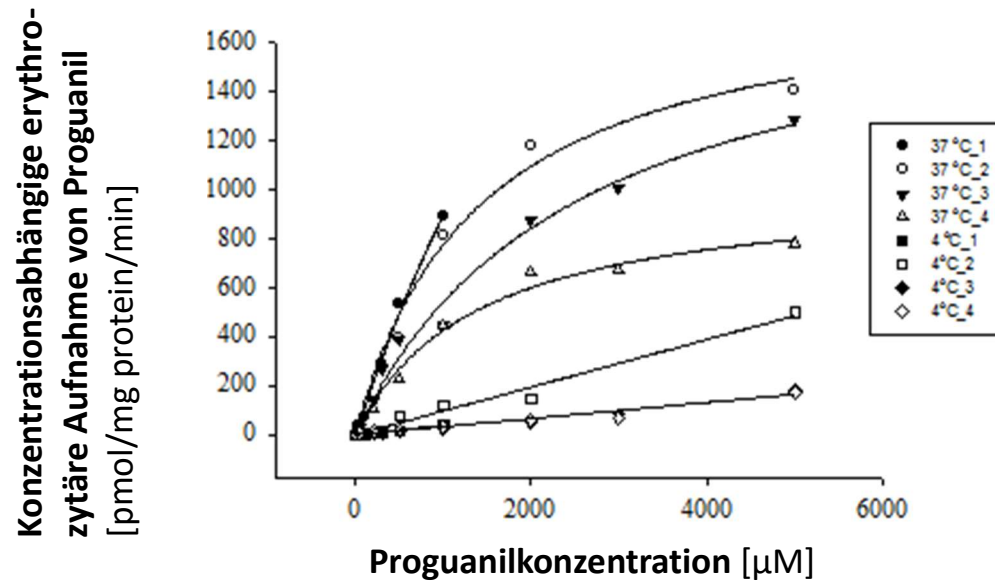


Abbildung 3-42: Kurvenschar der erythrozytären Aufnahme von Proguanil

Die Abbildung zeigt vier unterschiedliche Versuche der erythrozytären Aufnahme mit aufsteigenden Konzentrationen [µM]. Die Versuche wurden bei 37°C sowie 4°C durchgeführt, Inkubationszeit [10Min].

Die konzentrationsabhängige erythrozytäre Aufnahme von Proguanil durch nichtinfizierte Erythrozyten zeigt eine Sättigung (**Abbildung 3-41**). Daraus kann geschlossen werden, dass der Transport von Proguanil sättigbar ist und nach der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Bestimmung des V_{Max} - und des K_{M} -Wertes zeigen, dass ab einer Konzentration von ca. 877 µM eine Sättigung eintritt und die maximale Transportgeschwindigkeit bei 1164 pmol/ mg Protein/min. liegt.

3.4.3 OCT- Inhibition von Proguanil an Erythrozyten

Die Versuche der Inhibition mittels MPP^+ bei 3.4.1 sowie der konzentrationsabhängigen erythrozytären Aufnahme von Proguanil bei 3.4.2 zeigten, dass der Transport von Proguanil inhibiert werden kann und sättigbar ist. Durch die Zugabe spezifischer Inhibitoren einzelner OCTs mit unterschiedlichen Konzentrationen wurde versucht, die Aufnahme von Proguanil [200 µM] zu reduzieren oder gar zu blockieren. Die **Abbildung 3-43** zeigt die erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei gleichzeitiger Gabe eines Substrats für die

einzelnen organischen Kationentransporter. Naringin, ein Substrat des organischen Anionentransporters (OATP), wurde ebenfalls getestet.

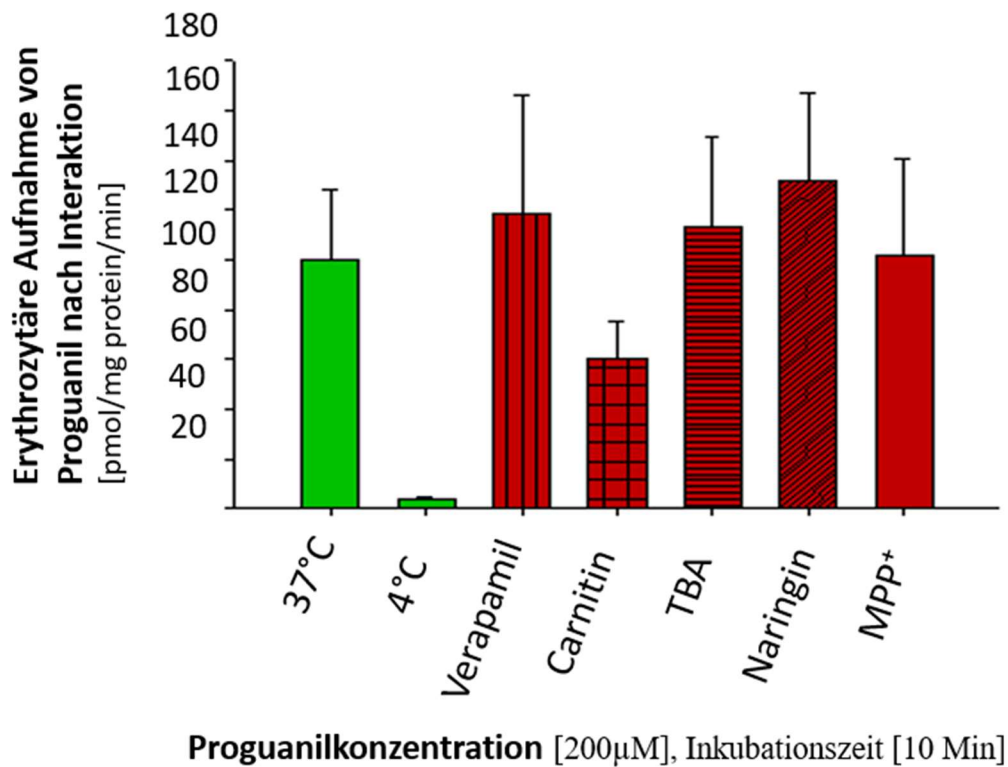


Abbildung 3-43: Inhibition der Aufnahme von Proguanil

Alle Inhibitoren außer L-Carnitin können die Aufnahme von Proguanil [200 µM] nicht blockieren. L-Carnitin hemmt die Aufnahme von Proguanil [200 µM] auf ca. 60% vom Ausgangswert für Proguanil (100%). L-Carnitin ist ein spezifischer Inhibitor der Zwitterionen-Transporter OCTN1 sowie OCTN2. Die Hemmung mittels MPP⁺ zeigt bei der obigen Konzentration keine Wirkung auf die Aufnahme von Proguanil. Daher scheint die Konzentration an MPP⁺ nicht ausreichend gewesen zu sein.

3.5 Ergebnisse der Methodenvalidierung von Amisulprid

Ziel der Methodenvalidierung war es, Amisulprid an mit OCT1-3, OCTN1 und OCTN2 transfizierten HEK293-Zellen mittels HPLC zu bestimmen. Dazu wurde die Methode von (Kudris et al., 2011) modifiziert. Die Zusammensetzung des Fließmittels wurde dahingehend verändert, dass es zu einer Reduzierung des Lösungsmittelanteils im Fließmittel von 35% auf 12% kam. Somit konnte ein Tailing, also eine asymmetrische Peakform, bei der das vordere Teil des Peaks im Gegensatz zum hinteren Teil steiler zur Grundlinie ist, beseitigt werden. Darüber hinaus wurde ein Säulenofen mit 40°C eingesetzt, um die Temperatur Konstanz der Reproduzierbarkeit der Daten zu erhalten. Anschließend konnten die einzelnen Parameter der Methodenvalidierung berechnet werden. Eine umfassende Darstellung aller Ergebnisse, die unter Verwendung der Methode in enger Kooperation mit Herrn Dr. Joao Dos Santos de Pereira erzielt wurde, ist bereits publiziert (Dos Santos Pereira et al., 2014).

3.5.1 Kalibratoren

Die Kalibratoren wurden in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 ng/ml hergestellt. Sie wurden mittels Dreifachbestimmung an drei unterschiedlichen Tagen bestimmt. Die Verdünnungsreihe ist in der Methodenbeschreibung (2.5) aufgeführt. Die Anzahl der jeweiligen Kalibratoren (n) lag bei 18.

3.5.2 Qualitätskontrollen

Es wurden drei Qualitätskontrollen zu Beginn der Messversuche hergestellt und bei -20°C gelagert. An jedem Versuchstag wurden sie aufgetaut und vermessen. Sie lagen im Konzentrationsbereich von 0,5, 5, und 50 ng/ml. Die Anzahl der jeweiligen Qualitätskontrollen (n) lag bei 18.

3.5.3 Präzision

Wie bei 2.2.3.2 bereits definiert und erwähnt, wurde die Präzision der Kalibratoren sowie der Qualitätskontrollen anhand der erläuterten Tests bestimmt.

3.5.3.1 Präzisionsberechnung der Kalibratoren

Zur weiteren Berechnung der Präzision liegen in **Tabelle 3-16** die statistischen Werte für den Mittelwert, die Standardabweichung sowie den Variationskoeffizienten der einzelnen Kalibratoren (K) vor. Die Kalibratoren sind nach aufsteigender Konzentration wie unter 3.2.2 aufgeführt.

Tabelle 3-16: Auswertung der statistischen Werte der Kalibratoren

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
\bar{x}	0,179	0,527	1,147	5,118	10,303	25,220	50,115
s	0,034	0,125	0,182	0,377	0,409	0,859	0,856
$1/k$	0,190	0,238	0,159	0,074	0,040	0,034	0,017

Anschließend wurde anhand der **Gleichung 2-7** die Prüfgröße nach *David* bestimmt und mit dem tabellarischen Wert aus der *David*-Tabelle im Anhang verglichen. Die Berechnung erfolgte für alle Kalibratoren. Dabei ergab sich folgende Auswertung (**Tabelle 3-17**):

Tabelle 3-17: Auswertung der einzelnen Kalibratoren nach David

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
<i>PG</i>	3,2	3,61	3,24	3,98	4,27	3,73	3,93
$g_u - g_o$	2,58-4,01	2,58-4,02	2,88-4,60	2,92-4,67	2,92-4,68	2,58-4,02	2,75-4,34

Aus den Berechnungen geht hervor, dass die Werte aller Kalibratoren der signifikanten Wahrscheinlichkeit von 99% nach normalverteilt sind. Die berechneten Prüfgrößen befinden sich innerhalb des Bereiches, der durch David vorgegeben wird. Der Grubbs-Test wurde aufgrund des Verdachts auf Ausreißer innerhalb der Messreihen durchgeführt (**Tabelle 3-18**).

Tabelle 3-18: Auswertung der Kalibratoren nach Grubbs

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
Q	1,617	2,144	1,434	1,698	1,756	1,281	1,172
P (95%)	2,234	2,234	2,475	2,504	2,504	2,234	2,371
P (99%)	2,485	2,485	2,785	2,821	2,821	2,485	2,659

Weder nach einer signifikanten Wahrscheinlichkeit von 99% noch bei einer 95%igen Wahrscheinlichkeit können die ermittelten Messdaten der einzelnen Kalibratoren als Ausreißer erklärt werden. Sie liegen unter dem tabellarischen Grubbs-Wert für $P = 99\%$ sowie $P = 95\%$.

3.5.3.2 Präzisionsberechnung der Qualitätskontrollen

Die Auswertung der benötigten statistischen Werte können aus **Tabelle 3-19** entnommen werden.

Tabelle 3-19: Berechnung der statistischen Werte der Qualitätskontrollen

	Q1= 0,5ng/ml	Q2= 5ng/ml	Q3= 50ng/ml
\bar{x}	0,646	5,164	51,124
S	0,173	0,466	1,253
Vk	0,269	0,090	0,025

Anschließend wurden der David-Test sowie der *Grubbs*-Test angewandt und berechnet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse, die in den **Tabellen 3-20** sowie **3-21** dargestellt sind:

Tabelle 3-20: Berechnung der einzelnen Qualitätskontrollen nach David

	Q1= 0,5ng/ml	Q2= 5ng/ml	Q3= 50ng/ml
PG	2,605	2,813	2,698
$g_u - g_o$	2,35 - 3,74	2,58 - 4,01	2,35 - 3,74

Durch die Berechnung der Prüfgröße nach *David* und dem Vergleich mit dem tabellari-schen Wert, der durch *David* angegeben wird, kann bei allen drei Qualitätskontrollen bei der jeweiligen Anzahl an Messdaten von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Tabelle 3-21: Berechnung der Qualitätskontrollen nach Grubbs

	Q1= 0,5ng/ml	Q2= 5ng/ml	Q3= 50ng/ml
Q	1,259	1,421	1,695
P (95%)	2,032	2,234	2,032
P (99%)	2,221	2,032	2,221

Alle berechneten Prüfgrößen Q für die Bestimmung nach *Grubbs* lagen unter den tabellarischen *Grubbs*-Werten für P = 99% sowie P = 95. Es befinden sich keine Ausreißer in den Datenreihen der Qualitätskontrollen.

3.5.4 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurde der Sollwert-t-Test für die einzelnen Kalibratoren und Qualitätskontrollen durchgeführt und mit der Tabelle des t-Tests im Anhang verglichen und interpretiert. Dabei wird ein Vertrauensintervall von P = 95% herangezogen.

Tabelle 3-22: Sollwert-t-Test der Kalibratoren

	K1 [ng/ml]	K2 [ng/ml]	K3 [ng/ml]	K4 [ng/ml]	K5 [ng/ml]	K6 [ng/ml]	K7 [ng/ml]
t (b*)	7,705	0,716	3,330	1,328	3,142	0,849	0,519
t (t*)	2,201	2,201	2,110	2,101	2,101	2,201	2,131

(b* = berechnet, t* = tabellarisch)

Tabelle 3-23: Sollwert-t-Test der Qualitätskontrollen

	Q1= 0,5ng/ml	Q2= 5ng/ml	Q3= 50ng/ml
<i>t</i> (berechnet)	2,370	1,167	2,533
<i>t</i> (tabellarisch)	2,306	2,201	2,306

Bei Q1 und Q3 sind die berechneten t-Werte größer als deren tabellarischer t-Wert. Q2 hingegen befand sich im Vertrauensintervall unter 95%.

3.5.5 Linearität

Die Linearität der Kalibratoren (**Abbildung 3-44**) wurde durch die **Gleichung 2-8** bestimmt. Grundlage war die lineare Regression. Die Bestimmung von R^2 ergibt einen Wert von 0,9942.

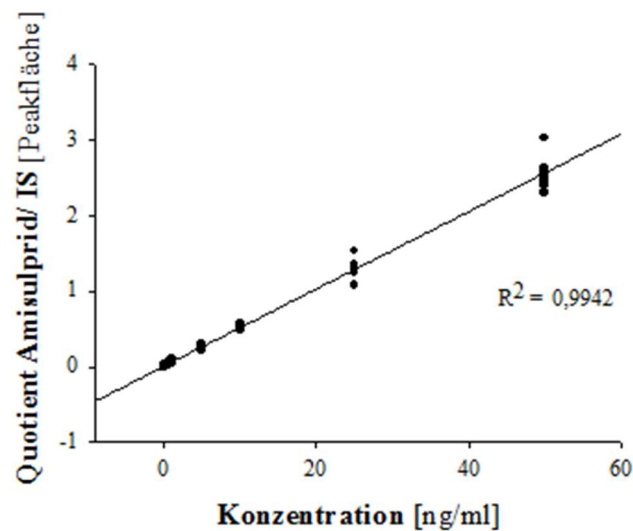


Abbildung 3-44: Darstellung der Linearität der Kalibriergeraden für Amisulprid.

Die x-Achse beschreibt die Kalibratoren mit aufsteigender Konzentration [ng/ml], die y-Achse gibt den Quotienten aus der Peakfläche der Kalibratoren dividiert durch den internen Standard **Metoclopramid** (MCP) wieder.

Die Linearität der Messwerte der Qualitätskontrollen (**Abbildung 3-45**) wurde identisch zu der Linearität der Kalibratoren (**Abbildung 3-44**) bestimmt. Der Korrelationskoeffizient R^2 ergab hier einen Wert von 0,9989. Somit ist die Linearität gegeben.

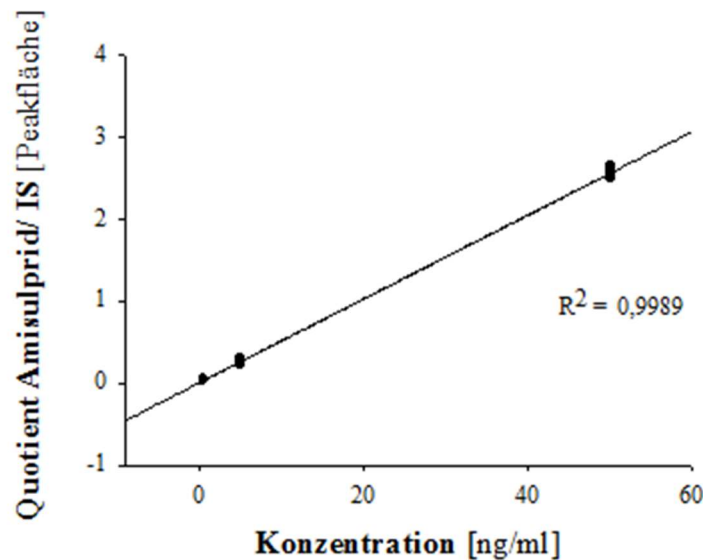


Abbildung 3-45: Darstellung der Linearität der Qualitätskontrollen für Amisulprid.

Die x-Achse beschreibt die Qualitätskontrollen mit aufsteigender Konzentration [ng/ml], die y-Achse gibt den Quotienten aus der Peakfläche der Qualitätskontrollen dividiert durch den internen Standard **Metoclopramid** (MCP) wieder.

3.5.6 Darstellung der Chromatogramme

Die Chromatogramme für Amisulprid sind im Folgenden (**Abbildung 3-46**) für 1 ng/ml sowie (**Abbildung 3-47**) für 10 ng/ml mit dem internen Standard gezeigt. Beide Peaks sind gut voneinander getrennt und eindeutig ohne eine Beeinflussung durch ein Hintergrundrauschen zu identifizieren.

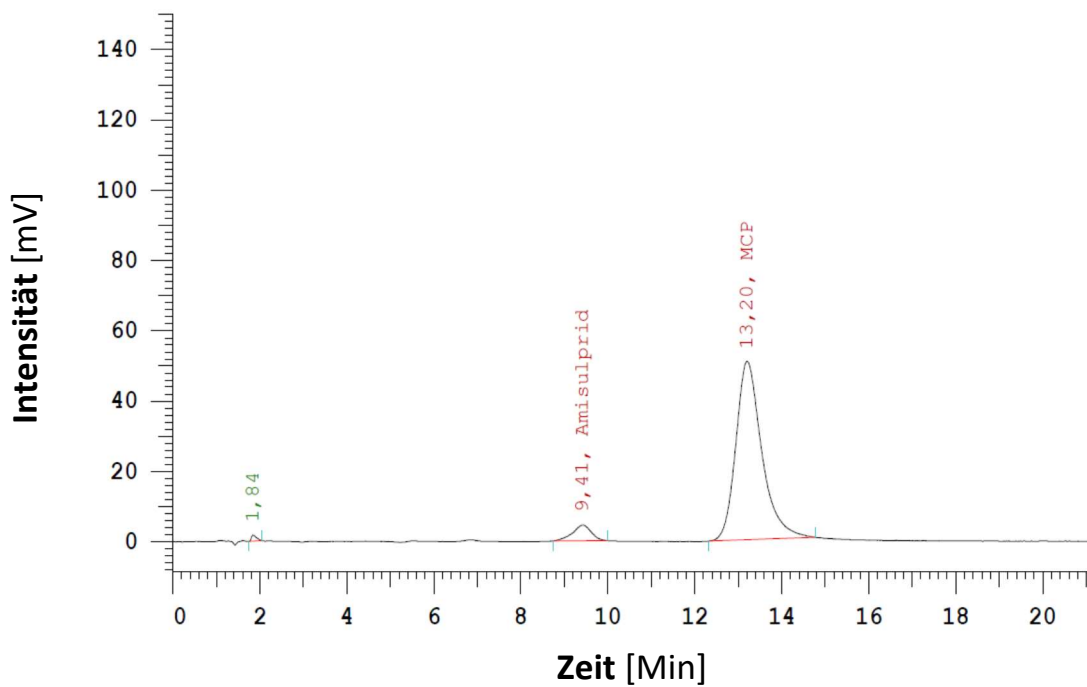


Abbildung 3-46: 1. Chromatographische Darstellung von Amisulprid und Metoclopramid (MCP).

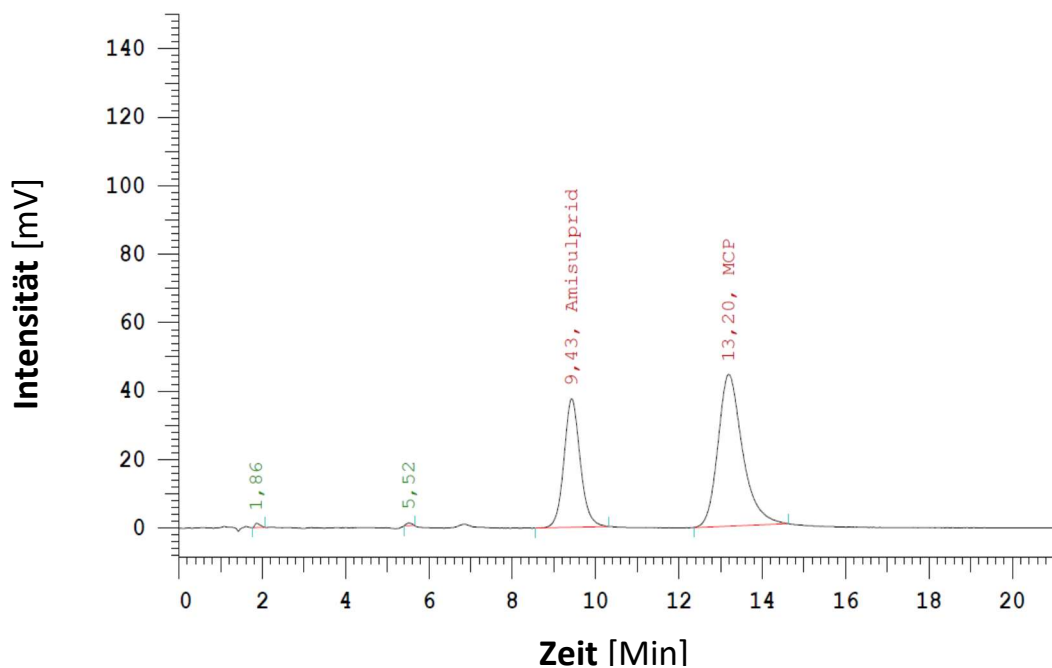


Abbildung 3-47: 2. Chromatographische Darstellung von Amisulprid und Metoclopramid (MCP).

Die Darstellung der Chromatogramme für (**Abbildung 3-48**) Sultoprid (5 ng/ml) sowie (**Abbildung 3-49**) Tiaprid (5 ng/ml) zeigen ebenfalls eine Detektierbarkeit der beiden

Arzneistoffe mit der validierten Methode. Beide Peaks sind jeweils gut vom internen Standard getrennt und werden nicht durch ein störendes Hintergrundrauschen beeinflusst.

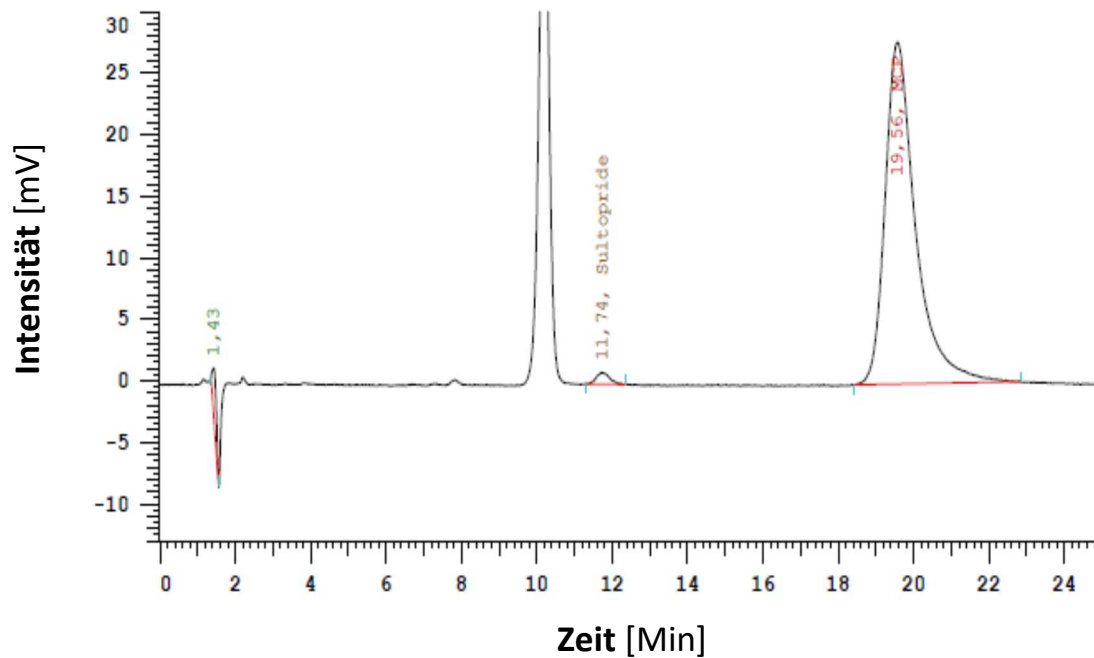


Abbildung 3-48: Chromatographische Darstellung von Sultoprid und Metoclopramid (MCP).

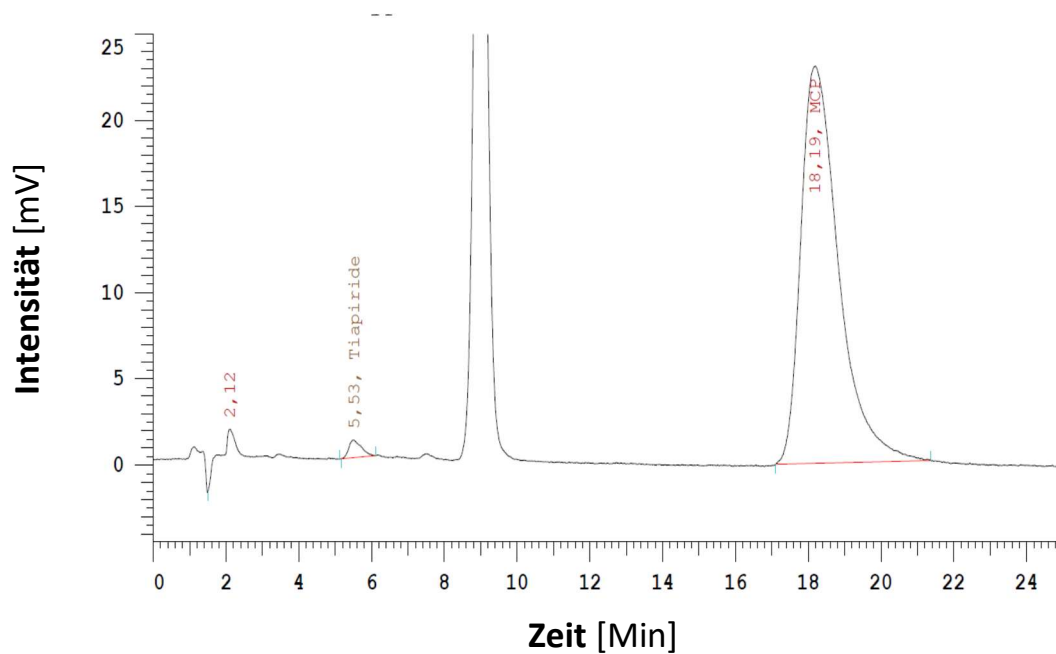


Abbildung 3-49: Chromatographische Darstellung von Tiaprid und Metoclopramid (MCP).

3.5.7 Probenvorbereitung

Das Lysat der Proben, in dem sich der Arzneistoff Amisulprid sowie der interne Standard (IS) Metoclopramid (MCP) befanden, wurde in einem Stickstoff-Evaporator für ca. 40 Minuten abgedampft, sodass Arzneistoff sowie interner Standard nach Verlust des Lösungsmittels zurückblieben. Anschließend wurde der Rückstand mit 100 µl Fließmittel mit einer Eppendorf-Pipette aufgenommen, in das HPLC-Gläschen überführt und über den Autosampler mit automatisierter Injektionsspritze 50 µl in die Dosierschleife injiziert. Die Qualitätskontrollen wurden an jedem Versuchstag aufgetaut, die Kalibratoren frisch hergestellt und injiziert.

3.6 Konzentrationsbestimmung von Debrisoquin

3.6.1 Methodenvalidierung

Wie im Abschnitt 2.2.3 erläutert, wurde bei der Konzentrationsbestimmung von Debrisoquin eine Methode modifiziert, die bereits in der Literatur Anwendung fand (Pereira et al., 2000). Zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC wurde bei der oben genannten Methode die Konzentration des Natriumacetatpuffers auf 50 mM erhöht. Dies führte zu längeren Waschprozessen der HPLC-Säule, da sonst das Natriumacetat auskristallisiert wäre und zu einer nachhaltigen Schädigung der HPLC-Säule geführt hätte. Als interner Standard wurde Venlafaxin genutzt. Es wurden drei Kalibratoren mit den Konzentrationen von 20 ng/ml, 200 ng/ml sowie 2000 ng/ml eingesetzt. Sie wurden vor der Freigabe an drei verschiedenen Tagen in einer Dreifachbestimmung vermessen. Dabei wurde Debrisoquin sowie 4-Hydroxydebrisoquin als Referenzfestsubstanz in Lösung gebracht und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) lag bei 10 ng/ml, die Nachweisgrenze (LOD) bei 1 ng/ml. Die Auswertung wurde in Kooperation durchgeführt und die Ergebnisse gemeinsam publiziert (Saadatmand et al., 2012). Die modifizierte Methode kann sowohl für Debrisoquin als auch für 4-Hydroxydebrisoquin genutzt werden. Die Peaks zeigen ein Tailing, was mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der

Temperatur der Säule, des pH-Wertes oder durch das Entfernen der Vorsäule nicht behoben werden konnte. Auch eine Veränderung der Flussrate führte nicht zum Erfolg. Daher wurden die Peakformen als akzeptabel erachtet. Die Integration der Peaks wurde manuell erstellt. Die Darstellung zweier Konzentrationen von Debrisoquin mit 20 ng/ml (**Abbildung 3-50**) sowie 200 ng/ml (**Abbildung 3-51**) sind hier dargestellt:

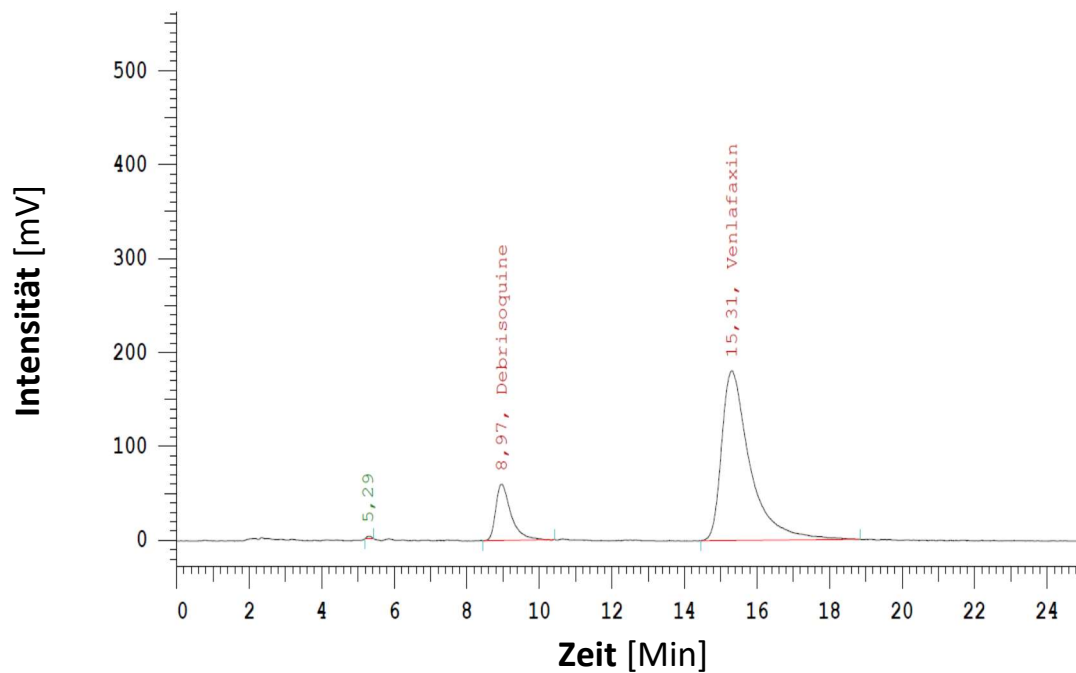


Abbildung 3-50: Chromatographische Darstellung von Debrisoquin und Venlafaxin.

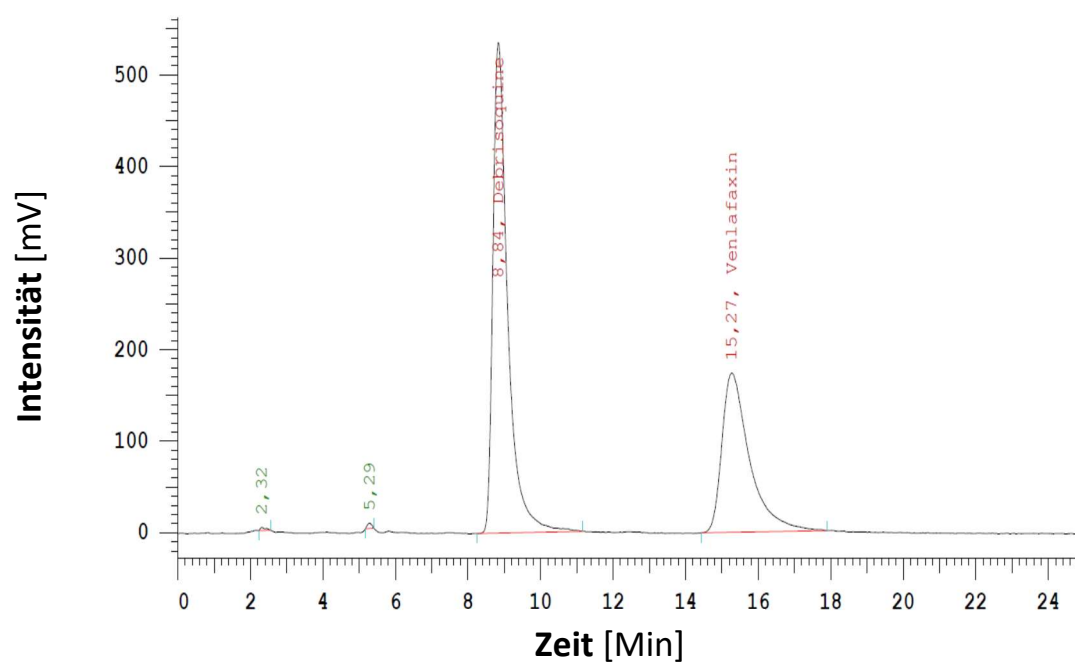


Abbildung 3-51: Chromatographische Darstellung von Debrisoquin und Venlafaxin.

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Auswahl der Methode für Proguanil und Cycloguanil

Verschiedene Methoden zur Bestimmung von Proguanil und Cycloguanil wurden vorab getestet. Keine der verwandten Methoden (Benjamin U. Ebeshi, 2005; Bergqvist et al., 1998; Bergqvist and Hopstadius, 2000; Chaulet et al., 1994; Helsby et al., 1993; Hoskins et al., 1997; Kusaka et al., 1996) konnte die gewünschten von uns festgelegten Spezifikationen erreichen. Durch Veränderungen der Methode von Edstein (Edstein, 1986) konnte eine für uns nutzbare Sensitivität erreicht werden. Darüber hinaus ist die Anwendbarkeit einer Methode abhängig von den vorzufindenden Gegebenheiten im Labor. Nicht jede Methode kann auf jedes Labor transferiert werden. Des Weiteren ist nicht jede chromatographische stationäre Phase in den wesentlichen Charakteristika (Partikelform und -größe, Porengröße, Beschichtung, Länge der Säule, Packungsdichte) identisch. Unterschiedliche Hersteller haben differenzierte Spezifikationen und Anforderungen an ihr Produkt. Daher ist die eigene Methodenoptimierung und Methodvalidierung mit eigenen Spezifikationen sowie der Vorschriften der FDA (2001) von großer Bedeutung. Für Proguanil und Cycloguanil konnte mit der modifizierten Methode unter 2.9.2 gut reproduzierbare Ergebnisse mit einer hohen Sensitivität (LOQ = 10ng/ml für Proguanil und 5 ng/ml für Cycloguanil) erzielt werden. Die Herabsetzung des pH-Wertes des Fließmittels auf 2,6 beruhte darauf, dass ein saurer Eluent sinnvoll für die Trennung von Säuren und schwachen, organischen Basen sein kann. Bei organischen Basen kann sogar schon der organische Charakter ausreichen, sodass es doch zu Wechselwirkungen mit der apolaren Phase kommt, bei der die Auflösung ausreichend ist, wie es hier der Fall war.

4.1.1 Methodenoptimierung und Methodvalidierung

Die Methode musste für die zur Verfügung stehende HPLC-Apparatur verwendbar sein. Dabei wurden diverse chromatographische Säulen mit Längen von 12,5 cm, sowie 25 cm Länge mit unterschiedlicher Partikelgröße (3 μ M, 5 μ M) unterschiedlichster Hydrophobie und Polarität (C8, C18) der stationären Phase sowie verschiedene „reversed phase“-

Säulen angewandt. Des Weiteren wurden ebenso Vorsäulen (C8, CN) eingesetzt, um eine saubere Trennung zu erzielen. Die Detektion bei einer Wellenlänge < 210 nm führte durch den Anteil an Störpeaks dazu, dass nicht nur der Analyt, sondern auch viele körpereigene Substanzen oder in unserem Fall auch viele andere in der Zellkultur enthaltene Substanzen und lysierte Zellbestandteile das UV-Licht der niedrigen Wellenlängen absorbieren. Daher sind niedrige Wellenlängen eher unselektiv. Bei höheren Wellenlängen als 200nm tritt eine Absorption auf, wenn das zu detektierende Molekül wie im Fall von Proguanil und Cycloguanil konjugierte Doppelbindungen sowie einen aromatischen Ring (Benzen) aufweisen (Meyer, 2009). Die oben genannten Gruppen absorbieren in unterschiedlicher Weise. Der Absorptionskoeffizient ϵ ist das Maß für die Lichtabsorption. *„Aromaten besitzen hohe Extinktionskoeffizienten, Ketone eher einen kleinen Extinktionskoeffizienten“* (Meyer, 2009).

Des Weiteren wurde ein gekühlter Autosampler genutzt, der die Lagerung der Proben bei 4°C nachstellte, da alle Proben bis zur Analyse bei 4°C gelagert wurden. Für die Trennung an der stationären Phase konnte durch einen Säulenofen eine konstante Temperatur geschaffen werden. Dies war durch Schwankungen der Temperatur im Labor und die Auswirkungen auf die Trennung und die Reproduzierbarkeit ein bedeutender Parameter. Ein weiterer Einflussfaktor war der pH-Wert des Fließmittels sowie des Analyten. Auch hier wurde durch den Einsatz von Natriumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 2,6, welches mit 85%iger Phosphorsäure eingestellt wurde, Abhilfe geschaffen. So konnte ein Puffersystem erzeugt werden, das es ermöglichte, die Analysen über die gesamte Messdauer mit symmetrischen Peakformen zu bestimmen (Kapitel 4.2). Die Validierung erfolgte mit fünfmaliger Wiederholung der Messungen der Arzneistoffe Proguanil und Cycloguanil mit dem internen Standard Pyrimethamin an fünf unterschiedlichen Tagen. Dadurch konnte die Robustheit der Methode dokumentiert werden. Die statistische Auswertung der Daten der Kalibratoren und Qualitätskontrollen zeigt eine erfolgreiche Methodenoptimierung und Methodenvvalidierung.

4.2 Membranpermeabilität der Antimalariamittel Proguanil und Cycloguanil am PAMPA-Assay

Das im Rahmen dieser der Dissertation untersuchte Antimalariamittel Proguanil und dessen Hauptmetaboliten Cycloguanil sind hydrophile Substanzen. Sie sind schwache Basen und liegen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 zu 99,8% protoniert vor. Sie entsprechen den Voraussetzungen, um von den organischen Kationentransportern der SLC22-Familie transportiert zu werden. Cycloguanil ist durch die Ausbildung des 1,3,5-Triazin-2,4-diamin-Ringsystems lipophiler als Proguanil mit seiner 1-(P-Chlorophenyl)-5-isopropylbiguanid-Struktur (**Abbildung 4-1**). Die Biguanid-Struktur ähnelt der in Metformin, dessen Transport über OCTs bereits erforscht wurde (Dresser et al., 2002; Kimura et al., 2005; Shu et al., 2007; Tzvetkov et al., 2009).

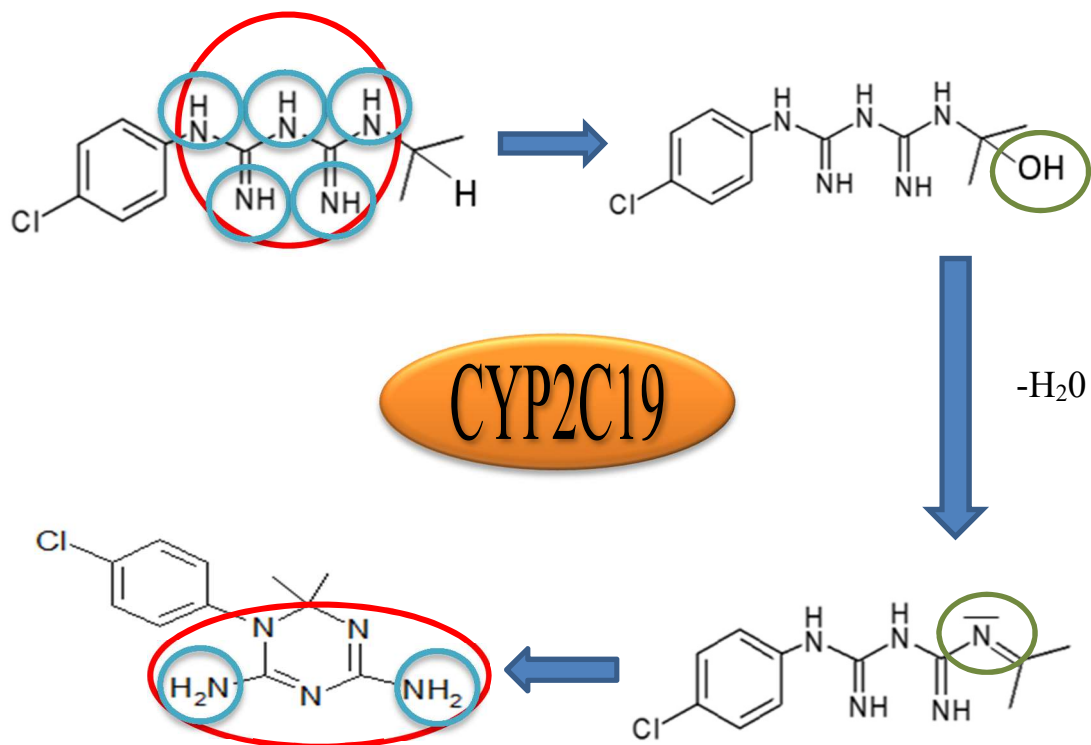


Abbildung 4-1: Chemische Strukturen und reagierende Gruppen an Proguanil (A) und Cycloguanil (B)

Rot markiert ist in **Abbildung 4-1** die Biguanid-Struktur von Proguanil (A) und die Zyklisierung der Biguanid-Struktur an Cycloguanil (B) über CYP2C19, welche als Monooxygenase ein Sauerstoffatom zu Beginn einführt (grüne Einkreisung) und anschließend

das Sauerstoffatom zu Wasser reduziert ($-H_2O$). Dadurch kommt es an der Position 1,2 des Proguanilmoleküls zu einer Elimination der OH-Gruppe sowie des Wasserstoffatoms an der sekundären Aminogruppe. Anschließend kommt es zur Zyklisierung.

Die Aminogruppen von Proguanil (**A**) und Cycloguanil (**B**) im Ringsystem mit freien sekundären Aminogruppen (blau) in **Abbildung 4-1** könnten Wasserstoffbrückenbindungen am OCT1-Transporter ausbilden (Szatylowicz (2008)). Auch wurde durch (Moaddel et al., 2005) beschrieben, dass ein Elektronendonorpaar für die Bindung an OCT1 wichtig sein kann. Aufgrund der höheren hydrophilen Struktur von Proguanil erweist es sich als ein besseres Substrat des OCT1-Transporters als Cycloguanil. Dieser Unterschied lässt sich von der Biguanid-Struktur des Proguanils im Vergleich zu Cycloguanil und dessen Ringstruktur ableiten und erklärt die niedrigere Lipophilie. Der Versuch am PAMPA zeigte, dass Transporter nötig sind, um Proguanil und Cycloguanil in die Zellen hinein und aus ihnen hinaus zu transportieren, für Proguanil mehr als für Cycloguanil. Je höher der $\log D_{7,4}$ -Wert einer Substanz ist, desto stärker dringt die Substanz mittels passiver Diffusion durch die Membran hindurch. Im Fall von Proguanil beträgt sie $-0,62$, für Cycloguanil $-0,06$. Daher ist für Cycloguanil eine stärkere passive Diffusion als für Proguanil zu erkennen. Im Vergleich dazu gibt es Arzneistoffe wie Venlafaxin ($\log D_{7,4} = 1,8$, **PE-Wert** von $6,2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$), die praktisch ohne Transporter in die Leberzelle diffundieren, wohingegen O-Desmethylvenlafaxin ($\log D_{7,4} = 1,2$, **PE-Wert** von $0,9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) einen Transporter benötigt (Abu Abed, 2013). Proguanil, mit einem **PE-Wert** von $1,77 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ zeigt ebenso einen erhöhten Bedarf eines Carrier-vermittelten Transports als sein aktiver Metabolit Cycloguanil mit einem **PE-Wert** von $2,41 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$.

4.3 Antimalariamittel Proguanil und dessen aktiver Metabolit Cycloguanil als Substrate für OCT

Im Rahmen der in der vorliegenden Dissertation zugrundeliegenden Untersuchungen wurden Proguanil und dessen Hauptmetabolit Cycloguanil als Substrate der organischen Kationentransporter der SLC22-Familie identifiziert. Proguanil wird jedoch deutlich stärker transportiert als Cycloguanil. Es konnte festgestellt werden, dass Proguanil mit einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ sowie Cycloguanil mit einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ in In-

vitro-Versuchen an mit OCT überexprimierenden HEK293-Zellen durch OCT1, OCT2 sowie OCT3, jedoch nicht über die L-Carnitin-Transporter OCTN1 und OCTN2 transportiert werden können. Die Versuche mit einer Konzentration als auch die konzentrationsabhängigen Versuche, die der Michaelis-Menten-Kinetik folgen, bestätigen, dass OCT1, OCT2 und OCT3 den Influxtransport von Proguanil und Cycloguanil beschleunigen können.

4.4 **Bedeutung von OCT1-Proteinvarianten für die Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil *in-vitro***

Proguanil und Cycloguanil erzielen ihre Wirkung sowohl in der Leber als auch im Blut. Die Konzentration von Proguanil und Cycloguanil im Plasma und in den Erythrozyten variiert. Proguanil reichert sich in den Erythrozyten im Gegensatz zum Plasma stärker an. Bei Cycloguanil hingegen beobachtet man eine ähnliche Verteilung in den Erythrozyten wie im Plasma. Die Anwendung von 2 μ M Cycloguanil an OCT1 zeigte einen sehr geringen Transport im Vergleich zu Proguanil, woraus man schließen kann, dass deutliche höhere Konzentrationen an Cycloguanil nötig sind, um als Substrat der organischen Kationentransporter zu fungieren.

Über 60% der Arzneistoffe werden über Phase-I und Phase-II-Reaktion von der Leber metabolisiert. Da inzwischen einige Arzneistoffe wie Metformin (Tzvetkov et al., 2009), Morphin (Tzvetkov et al., 2013), Tramadol (Tzvetkov et al., 2011) und Tropisetron (Tzvetkov et al., 2012) bekannt sind, deren Influxtransport in die Leberzelle in einer auch in der Pharmakokinetik am Menschen nachweisbaren Weise vom OCT1-Transporter abhängt, um in die hepatische Zelle zu gelangen, ist zu befürchten, dass Proguanil und Cycloguanil als Inhibitoren der OCTs wirken könnten und die Aufnahme anderer Arzneistoffe, wie Tramadol, behindern. Dies kann zu einer verschlechterten Aufnahme, Verteilung und Elimination und einer vermehrten Anreicherung der nicht transportierten Substanzen im Gewebe führen. Daraus kann eine Steigerung der Häufigkeit an Nebenwirkungen des inhibierten Arzneistoffs herbeigeführt werden und Auswirkungen auf die Do-

sierung haben. Der Medikationsplan des Patienten müsste diesbezüglich überarbeitet werden. Allerdings müssten weitere In-vitro- und In-vivo-Analysen durchgeführt werden, bevor man Empfehlungen diesbezüglich geben kann.

Genetische Polymorphismen in den Arzneimitteltransportern wurden zunehmend als mögliche Quellen der Variation in der Arzneimitteldisposition und Wirkung beschrieben und erkannt (Giacomini et al., 2007). In früheren Studien wurde gezeigt, dass funktionelle Aminosäure-Substitutionen in der OCT1-Gensequenz zu einer Verringerung der OCT1-Aktivität führen können. Daraus ergeben sich bsp.-weise eine reduzierte hepatische Aufnahme von Metformin (Shu et al., 2007) und dadurch eine verminderten Wirksamkeit von Metformin (Tzvetkov et al., 2009). Es kann festgestellt werden, dass genetische Varianten einen Einfluss auf die Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil haben (siehe Kapitel 3.2.4 und 3.3.4). Die zelluläre Aufnahme wurde durch ausgewählte Polymorphismen reduziert. Etwa 10% der kaukasischen Bevölkerung haben eine erniedrigte Metabolisierungsgeschwindigkeit (poor metabolizer) (Nichols, Focht et al. 2011) für Substrate eines spezifischen Cytochrom-450-Enzyms, das CYP2D6. Genauso häufig tritt der Polymorphismus an OCT1 auf. Etwa 9% der kaukasischen Bevölkerung zeigen eine reduzierte Aktivität von OCT1 (Brockmoller and Tzvetkov, 2013).

Daraus ist abzuleiten, dass Patienten, die einen durch den Polymorphismus im OCT1-Gen bedingt erniedrigten Transport von Proguanil und Cycloguanil mit einer zusätzlich verminderten Metabolisierungsgeschwindigkeit aufgrund eines weiteren Polymorphismus des Enzyms CYP2C19 aufweisen, eine erschwerte Aufnahme und Verteilung des Arzneistoffs im Organismus zeigen könnten. Daher könnten die Polymorphismen am OCT-Gen einen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Proguanil und Cycloguanil haben. In-vitro-Versuche bestätigten diese Annahme anhand der Effekte der SNPs, die bei 9 % der Kaukasier vorkommen. In-vivo-Daten könnten eventuell Aufschluss über die Wichtigkeit des OCT1-Transporters sowie der Proteinvarianten für die Aufnahme von Proguanil und dessen Metaboliten geben. Im menschlichen Organismus, vor allem in der Leber, spielen, wie in **Abbildung 1-3** dargestellt, viele Transporter eine Rolle für die Aufnahme von organischen Kationen. Letztlich könnte Proguanil auch über einen weiteren Transporter in die Leberzelle gelangen, ohne OCT1 oder OCT3 zu nutzen.

4.5 Inhibition der Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil durch weitere Pharmaka an HEK 293-Zellen

Die vorliegende Dissertation kann darstellen, dass OCT1, OCT2 sowie OCT3 Proguanil und Cycloguanil transportieren können. Die gleichzeitige Gabe des Substrats organischer Kationentransporter MPP⁺ zeigte, dass eine Inhibition des Transports möglich ist (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.3.2). Zudem kann aus den Inkubationen mit weiteren Medikamenten, die möglicherweise in Komedikation mit Proguanil Patienten verabreicht werden, vermutet werden, dass bei gleichzeitiger Gabe weiterer Arzneistoffe die Aufnahme von Proguanil gehemmt werden könnte. Viele Medikamente hatten jedoch in relevanten Konzentrationen keinen Einfluss (Kapitel 3.2.5 und 3.3.5).

Die reduzierte Aufnahme von Proguanil vom Ausgangswert [100%] durch die Gabe (2 x C_{max}) der Arzneistoffe Mefloquin auf 68,1%, Doxycyclin auf 74,1%, Omeprazol auf 72,1% und Metoprolol auf 76,6% zeigen, dass die Interaktion mit weiteren Arzneistoffen durchaus bei der Verabreichung von Proguanil eine entscheidende Rolle spielen kann. Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol, der ebenso wie Proguanil über CYP2C19 verstoffwechselt wird, kann bei gleichzeitiger Gabe zu einem dazu führen, dass die Proguanilaufnahme reduziert wird (s.o.), zum anderen dazu, dass die Verstoffwechselung von Proguanil zu Cycloguanil verlangsamt wird. Dies wiederum kann zu einem reduzierten pharmakologischen Effekt und einer verminderten Wirksamkeit gegen die Malaria führen. Des Weiteren hat der Protonenpumpenhemmer Rabeprazol bei der zweifachen Gabe des C_{max} keine Reduzierung des Proguaniltransports gezeigt. Jedoch auch Rabeprazol wird über CYP2C19 verstoffwechselt. Auch hier kann es zu einer Verzögerung der Metabolisierung von Proguanil zu Cycloguanil kommen.

Der verringerte Transport von Proguanil kann einen erheblichen Einfluss auf die Anreicherung im Gewebe und die damit verminderte Metabolisierung von Proguanil zu Cycloguanil haben. Die Interaktion mit weiteren Arzneistoffen kann ebenso dazu führen, dass die Aufnahme der Arzneistoffe, die über denselben Transporter transportiert werden, gehemmt wird. Dies kann beispielsweise im Fall von Metformin dazu führen, dass der Arzneistoff zu einem geringen Anteil transportiert und dementsprechend seine Wirkung nicht entfalten kann. Das kann bei einem adipösen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und

einem BMI > 25 kg/m² schwerwiegende Folgen haben. Die Reduzierung der hepatischen Glukoseproduktion wird dadurch gefährdet.

Bei gleichzeitiger Gabe der Protonenpumpenhemmer Omeprazol und Rabeprazol zeigen In-Vitro-Versuche die konzentrationsabhängige Stimulation der Aufnahme von Cycloguanil. Dieses ist gegensätzlich zu Proguanil. Da Cycloguanil der aktive Metabolit des Arzneistoffs Proguanil ist, könnten erhöhte Konzentrationen der Protonenpumpenhemmer dazu führen, dass Cycloguanil stärker über die OCTs transportiert wird. Dies wiederum könnte zu einer schnelleren Wirkung führen.

Die Vorstellung, dass die Gabe von Arzneistoffen zu Proguanil dessen Transport hemmt, sollte auch in die entgegengesetzte Richtung untersucht werden. Die Möglichkeit, dass die Arzneistoffe, die hier zum Einsatz kamen, ebenfalls in ihrem Transport gehemmt werden könnten, wäre für Patienten, die einer Polymedikation unterliegen von großer Bedeutung.

4.6 **Bedeutung des erythrozytären Transports von Proguanil**

Bekannt ist, dass Retikulozyten, die im Gegensatz zu Erythrozyten einen Zellkern besitzen, verschiedenste Transportsysteme auf ihrer Zellmembran exprimieren. Durch die Reifung zum Erythrozyten und den damit verbundenen Verlust des Zellkerns sowie der Freisetzung in das Blut aus dem roten Knochenmark wird die Proteinexpression eingestellt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich im Blut weiterhin Retikulozyten befinden, die in unserem Fall das Proguanil aufgenommen haben. Der Anteil an Retikulozyten am Gesamtblut liegt etwa bei 1,5%. Es ist bekannt, dass Proguanil, ein Prodrug, das in der Leber über das Enzym CYP 2C19 zu Cycloguanil metabolisiert wird, ebenfalls, wie auch Cycloguanil, sich in den Erythrozyten nach einem Befall mit dem Parasiten *Plasmodium falciparum* anreichert. Bisher war die Aufnahme der beiden Arzneistoffe in die Erythrozyten nicht geklärt. Man geht davon aus, dass Parasiten in den befallenen Erythrozyten kleine Poren in der Zellmembran der Erythrozyten erzeugen, die dazu führen, dass entstandene Abfälle, die in der Zelle durch den Parasiten gebildet werden, darüber ausgeschieden werden. Weiterhin geht man davon aus, dass die Arzneistoffe, die sich bei einer Malariainfektion an der Zellmembran anreichern, auch über diesen Weg in das Zellinnere

gelangen. Dieser Weg wird „*new permeability pathway*“ genannt (Ginsburg and Stein, 2004). In der vorliegenden Dissertation konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Proguanil die Zellmembran nicht infizierter Erythrozyten passieren kann. Der PAMPA-Assay zeigt (Kapitel 4.3), dass Proguanil ein Transportsystem benötigt, um in hoher Geschwindigkeit Membranen zu überwinden.

Anders als die In-vitro-Analysen an HEK293-Zellen konnten die In-vitro-Versuche an Erythrozyten nicht zeigen, dass die erythrozytäre Aufnahme von Proguanil bei einer Konzentration von 200 μM mittels MPP^+ gehemmt werden kann, bei niedrigen Konzentrationen [2 μM und 20 μM] hingegen schon (Kapitel 3.4). Jedoch konnte an Erythrozyten gezeigt werden, dass L-Carnitin, ein typisches Substrat der OCTN1- und OCTN2-Transporter eine Reduzierung der erythrozytären Aufnahme von Proguanil auf ca. 60% des regulären Transports ohne Zugabe von L-Carintin herbeiführt. Auch konnte gezeigt werden, dass weitere Arzneistoffe auf die erythrozytäre Aufnahme von Proguanil nur bedingten Einfluss haben (siehe Kapitel 3.4.3). Zusammenfassend konnte in-vitro die zelluläre Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil als Substrate der OCT1, OCT2 und OCT3 an transfizierten HEK293-Zellen identifiziert werden. An OCTN1- und OCTN2- transfizierten HEK293-Zellen konnte kein Transport nachgewiesen werden.

4.7 Bestimmung von Amisulprid, Sultoprid und Tiaprid mittels HPLC

Amisulprid, Sultoprid sowie Tiaprid konnten detektiert werden. Beispiele der Chromatogramme der vier Arzneistoffe sind unter 3.5.6 aufgeführt. Die Parameter der Validierung zu Amisulprid beinhalten die Präzision, Richtigkeit sowie Linearität der Kalibratoren und Qualitätskontrollen. Die Berechnungen wurden unter Anwendung der unter 2.2.3 erläuterten Gleichungen durchgeführt. Die Chromatogramme zur Bestimmung von Amisulprid, Sultoprid sowie Tiaprid und dem internen Standard Metoclopramid konnten mit guter Auflösung sowie frei von Störpeaks dargestellt werden. Durch die Bestimmung des Variationskoeffizienten der Kalibratoren, der ab 1 ng/ml unter 15% lag, konnte eine gute Sensitivität sichergestellt werden. Durch die Verwendung der Methode konnte der

Transport von Amisulprid an die mit OCT1 bis OCT3 sowie OCTN1 und OCTN2 transfizierten HEK293-Zellen bestimmt sowie deren Konzentration anschließend ausgewertet werden (Dos Santos Pereira et al., 2014). Bereits publizierte Methoden zu quantitativen Bestimmung von Amisulprid und weiterer Neuroleptika (Bergemann et al., 2004; Chiba et al., 2003; Mogili et al., 2011; Nishihara et al., 1983) waren für uns nicht anwendbar.

Die Trennung der Substanzen erfolgte anlehnend an die Publikation von (Cerqueira et al., 2000) wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Das Fließmittel beinhaltete Triethylamin und Kaliumhydrogenphosphatpuffer (0,03M). Der Grund liegt hier in der symmetrischen Darstellung der Peaks bei einem pH-Wert von 6,5. Der Dissoziationszustand von alkalischen sowie sauren Komponenten und den freien Silanolgruppen, die nicht mit langkettigen Kohlenstoffresten modifiziert an der Oberfläche der stationären Phase vorliegen, werden durch den pH-Wert beeinflusst. Über den pH-Wert können die Wechselwirkungen zwischen Analyt und der stationären Phase beeinflusst und somit die Peakform und die Retentionszeit gesteuert werden. Unmodifizierte Silanolgruppen treten in Wechselwirkung mit basischen Komponenten, wenn sie negativ geladen sind. Dadurch kommt es zu einer Verlangsamung der Kinetik der Desorption des basischen Analyten von der stationären Phase. Dies wiederum führt in der Regel zum Tailing. Daher muss ein leicht saurer Eluent hinzugegeben (Kaliumhydrogenphosphatpuffer) werden, damit sich das Gleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz nach links verschiebt. Dadurch lagen die Silanolgruppen undissoziiert vor und gingen keine Wechselwirkungen mit unseren Analyten ein. Zur Trennung von stärkeren Basen muss im Neutralen oder gar im Alkalischen gearbeitet werden. Hier lagen die Basen neutral vor und traten mit der apolaren Umkehrphasen-Oberfläche in Wechselwirkung. Durch die Zugabe von einer Base wie Triethylamin zum Fließmittel wurden die Silanolgruppen blockiert. Das basische Lösungsmittel trat mit ihnen in Wechselwirkung und lies unseren Analyten mit den Alkylketten der modifizierten Silanolgruppen reagieren. Daher war die Zugabe von Triethylamin zum Kaliumhydrogenphosphat wichtig. Des Weiteren kann Triethylamin frei werdende Säuren innerhalb einer Reaktion binden. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Zusammensetzung des Laufpuffers für Sultoprid und Tiaprid lag bei 10% Acetonitril und 90 % 0,03M Kaliumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 6,5.

Alle Messungen wurden bei 40 °C durch den Einsatz eines Säulenofens begünstigt, wie oben bei Debrisoquin bereits beschrieben. Die Retentionszeiten lagen mit einer Abweichung von +/- 5% für Amisulprid und Metoclopramid etwa bei 9,3 Minuten und 12,3 Minuten, für Sultoprid bei ca. 12 Minuten und Tiaprid bei ca. 5 Minuten, bei Metoclopramid bei der zweiten Methode bei 19 Minuten. Die Berechnung und Auswertung erfolgten wie bei Proguanil und Cycloguanil

4.8 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden in Anlehnung an bereits publizierte Methoden Methoden zur Detektion von Arzneistoffen wie Proguanil, Cycloguanil, Amisulprid, und Debrisoquin modifiziert, optimiert und validiert. Der Influxtransport von den von uns genutzten Arzneistoffen konnte gezeigt und die transportierten Konzentrationen bestimmt und analysiert werden. Hinzu konnte gezeigt werden, dass Proguanil, ein Prodrug, welches in der Leber durch das Enzym CYP2C19 zu dem aktiven Metaboliten Cycloguanil verstoffwechselt wird, Transporter aus der Familie der SLC22-Familie nutzen könnte, um in die Leberzelle gelangen zu können.

Weiterhin wurde die Aufnahme durch die Gabe von Inhibitoren, die den Transport der OCT1, OCT2 und OCT3 sowie OCTN1 und OCTN2 hemmen, untersucht. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass aufgrund der reduzierten Aufnahme von Proguanil durch Zugabe von MPP⁺ OCT1 als Transporter für die Exkretion von Proguanil in die Hepatozyten verantwortlich ist. Ebenso wie OCT1 kann OCT3 Proguanil in die hepatische Zelle transportieren. Die Interaktion mit weiteren Arzneistoffen zeigt auf, dass der Transport der Arzneistoffe bei Vorliegen unterschiedlichster Konzentrationen weiterer Pharmaka gehemmt oder erhöht sein kann. Das wiederum kann bei Vorhandensein einer Polymedikation zu einer Einschränkung der Absorption, der Verteilung und der Elimination führen. Dies führt unweigerlich zu einem erhöhten Risiko der Nebenwirkungen, die zwangsläufig zu einer verminderten Patienten-Compliance führen.

Fortführend sollte der Effluxtransport der beiden Arzneistoffe analysiert werden. Zu beachten ist, dass eine bevorzugte Kationenaufnahme durch die organischen Kationentransporter bei einem physiologischen Membranpotenzial von -60 mV zu sein scheint. Da beide Arzneistoffe bei physiologischen pH-Wert von 7,4 protoniert vorliegen, ist dies möglich. Der Effluxtransport kann erfolgen, wenn die intrazelluläre Konzentration zehnfach höher ist als die Konzentration außerhalb der Zelle (Koepsell, Lips et al. 2007). Das kann durch Versuche einer zeitabhängigen Aufnahme von Proguanil und Cycloguanil untersucht werden. Sollte sich herausstellen, dass Proguanil mit einer Konzentration von 2 μ M und Cycloguanil mit 30 μ M nach einer bestimmten Zeit vermindert in den Zellen zu bestimmen sind, würde dies aufzeigen, dass die OCTs auch als Effluxtransporter für beide Arzneistoffe fungieren können. Somit könnte schließlich vermutet werden, dass ein großer Teil von Proguanil, der nicht verstoffwechselt wird, durch die OCTs aus der hepatischen Zelle befördert wird.

Bekannt ist, dass Proguanil zu 60% unverändert renal ausgeschieden wird (Estler, 2006). Interessanterweise zeigt OCT2 ebenfalls einen Transport von Proguanil und Cycloguanil. Da OCT2 vermehrt in der Niere und nicht in der Leber exprimiert wird (Koepsell et al., 2007), liegt der Verdacht nahe, dass Proguanil und Cycloguanil über den OCT2-Transporter aus der Niere ausgeschieden werden. Die Dosisanpassung bei Gabe von Proguanil als Prophylaxetherapie bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz wird diskutiert. Darüber hinaus sollten Festdosiskombinationen nicht mit einer Kreatinin-Clearance unter 60 ml/min bei Patienten angewandt werden, da die Tabletten für eine patientengerechte Dosisanpassung ungeeignet scheinen (Amet et al., 2013). Daher sollten ebenfalls Versuche der zeitabhängigen Aufnahme von Proguanil am OCT2-Transporter mit unter Einbeziehung der relevanten Polymorphismen durchgeführt werden.

Der OCT3-Transporter, der ebenfalls wie OCT1 in der Leber exprimiert wird, zeigt ebenso wie OCT1 und OCT2 einen Transport beider Arzneistoffe. OCT3 wird im Verhältnis zu OCT1 geringer in der Leber exprimiert. Möglich wäre, dass sich OCT1 und OCT3 den Influxtransport in die hepatische Zelle im Fall von Proguanil teilen. Eine größere Bedeutung kommt dem OCT3-Transporter bei Patienten zu, die Polymorphismen des OCT1-Transporters aufweisen. Hier könnte der OCT3-Transporter die verminderte Aufnahme von Proguanil über OCT1 kompensieren. Dieser Versuch kann mithilfe von

transfizierten HEK293-Zellen erfolgen, die sowohl OCT3 als auch Polymorphismen des OCT1 besitzen. Zusätzlich könnte durch die spezifische Inhibition des Transports mittels MPP⁺ für OCT1 und TBA für OCT3 gezeigt werden, ob und wieviel Proguanil über OCT3 bei gleichzeitigem Vorhandensein der Polymorphismen von OCT1 transportiert wird.

Bisher war nicht bekannt, wie Proguanil in die Erythrozyten gelangen kann, da Erythrozyten keinen Zellkern haben, um Transporterproteine exprimieren zu können. Vermutet wurde, dass die Vorstufe der Erythrozyten, die Retikulozyten, Transporterproteine bereits ausgebildet haben. Jedoch war bisher nicht erforscht, welche Transporter für den Influxtransport von Proguanil und Cycloguanil verantwortlich sind.

L-Carnitin, das eine Hemmung der OCTN1- und OCTN2-Transporter bewirkt, konnte in den In-vitro-Analysen der Erythrozyten einen Hinweis auf die Anwesenheit der OCTN1- und OCTN2-Transporter andeuten. Dies würde bedeuten, dass sich OCTN1 und OCTN2 auf der Erythrozytenmembran befinden. Der Versuch der erythrozytären Aufnahme zeigte eine Hemmung von ca. 60% zum Ausgangswert ohne Inhibition. Jedoch konnte der Transport von Proguanil an mit OCTN1 und OCTN2 transfizierten HEK293-Zellen diese Hypothese nicht stützen.

Daher könnte als nächster Schritt die Anwesenheit der Transportproteine der einzelnen OCTs durch Reaktion mit primären und sekundären Antikörpern über Western Blot untersucht werden. Es sind bereits Antikörper für OCT1, OCT2, OCT3 sowie für OCTN1 und OCTN2 bekannt.

Die Erkenntnis über die Aufnahme von Arzneistoffen, den Transport innerhalb und die Elimination in und aus dem menschlichen und tierischen Organismus stellt die Grundlage aller weiteren Schritte der Erforschung bereits bekannter und neuer innovativer Arzneimittel dar. Darüber hinaus werden so die Komplexität der Natur und unser Bestreben deutlich, neues Wissen zu schaffen. Die erythrozytäre Aufnahme von Proguanil und dessen Transport über die OCTs kann als Grundlage für weitere Untersuchungen zur Identifizierung der Pharmakokinetik des Arzneistoffs und dessen aktiven Metaboliten dienen. Des Weiteren kann die Suche nach OCTs auf der Oberfläche der Erythrozytenmembran ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Anreicherung beider Substanzen in den Erythrozyten sein.

5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sina Tadjerpisheh
Geburtsdatum	17.05.1982
Geburtsort	Teheran, Iran

Schulbildung

Juli 2001	Hainberg- Gymnasium Göttingen (Abitur)
-----------	--

Studium

2004 – 2010	Pharmaziestudium (Staatsexamen) Philipps-Universität Marburg
Sept. 2010	1. Teil des Praktischen Jahres im Institut Klinische Pharmakologie in der Universitätsmedizin Göttingen
März 2010 – Aug. 2011	2. Teil des Praktischen Jahres in der Goethe-Apotheke Göttingen
Sept. 2011 – Sept.2014	Stipendiat des Graduiertenkollegs 1034 an der Universitätsmedizin Göttingen zur Promotion am Institut Klinische Pharmakologie
Okt. 2014 – Nov. 2014	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut Klinische Pharmakologie in Göttingen (Promotion)

Beruf

Febr. 2012	Approbation zum Apotheker
März 2012 – Okt. 2014	Apotheker in der Hagenberg-Apotheke und in der Apotheke im Kaufpark in Göttingen
Nov. 2014 – Mai 2015	Apotheker in der Apotheke im Otto-Hirsch- Center in Stuttgart
seit Juni 2015	Apotheker in der Kosmas Apotheke MACHE in Ostfildern

Zusätzliche Qualifikationen

Computerkenntnisse:	Word, Excel und Power Point
Fortbildungen im Rahmen der Promotion:	Noveda-Seminar: „Laborexperte für Chromatographie“ „GLP in der Laborpraxis“
Fremdsprachen:	Englisch, Farsi

6. Literaturverzeichnis

Abu Abed, M. (2013). Patientenindividualisierte Therapie unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte – von der Patientenschulung bis zur Verwendung von molekularen Biomarkern (Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig).

Ahlin, G., Karlsson, J., Pedersen, J.M., Gustavsson, L., Larsson, R., Matsson, P., Norinder, U., Bergstrom, C.A., and Artursson, P. (2008). Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *Journal of medicinal chemistry* 51, 5932-5942.

Allison, D.B., Mentore, J.L., Heo, M., Chandler, L.P., Cappelleri, J.C., Infante, M.C., and Weiden, P.J. (1999). Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 156, 1686-1696.

Amet, S., Zimmer-Rapuch, S., Launay-Vacher, V., Janus, N., and Deray, G. (2013). Malaria prophylaxis in patients with renal impairment: a review. *Drug safety* 36, 83-91.

Barendt, W.M., and Wright, S.H. (2002). The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *The Journal of biological chemistry* 277, 22491-22496.

Bauer, F., Führer (1999). *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie*.

Benjamin U. Ebeshi, Oluseye O. Bolaji, Festus A. Ogunbona (2005). Sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of proguanil and its metabolites, cycloguanil and 4- chlorophenylbiguanide in biological fluids. *African Journal of Biotechnology* 4 (8), 856-861.

Bergemann, N., Kopitz, J., Kress, K.R., and Frick, A. (2004). Plasma amisulpride levels in schizophrenia or schizoaffective disorder. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14, 245-250.

Bergqvist, Y., Funding, L., Kaneko, A., Krysen, B., and Leek, T. (1998). Improved method for the simultaneous determination of proguanil and its metabolites by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction of 100-microl capillary blood samples dried on sampling paper. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 719, 141-149.

Bergqvist, Y., and Hopstadius, C. (2000). Simultaneous separation of atovaquone, proguanil and its metabolites on a mixed mode high-performance liquid chromatographic column. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 741, 189-193.

Bernhardt, I., Hall, A.C., and Ellory, J.C. (1991). Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport. *The Journal of physiology* 434, 489-506.

Brockmoller, J., and Tzvetkov, M.V. (2008). Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *European journal of clinical pharmacology* 64, 133-157.

Brockmoller, J., and Tzvetkov, M.V. (2013). Polymorphic OCT1: a valid biomarker, but for which drugs? *Pharmacogenomics* 14, 1933-1936.

Budiman, T., Bamberg, E., Koepsell, H., and Nagel, G. (2000). Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *The Journal of biological chemistry* 275, 29413-29420.

Burckhardt, G., and Wolff, N.A. (2000). Structure of renal organic anion and cation transporters. *American journal of physiology Renal physiology* 278, F853-866.

Burns, T., and Bale, R. (2001). Clinical advantages of amisulpride in the treatment of acute schizophrenia. *J Int Med Res* 29, 451-466.

Busch, A.E., Quester, S., Ulzheimer, J.C., Waldegger, S., Gorboulev, V., Arndt, P., Lang, F., and Koepsell, H. (1996). Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *The Journal of biological chemistry* 271, 32599-32604.

- Carrington, H.C., Crowther, A.F., Davey, D.G., Levi, A.A., and Rose, F.L. (1951). A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nature* 168, 1080.
- Cerqueira, P.M., Mateus, F.H., Cesarino, E.J., Bonato, P.S., and Lanchote, V.L. (2000). Enantioselectivity of debrisoquine 4-hydroxylation in Brazilian Caucasian hypertensive patients phenotyped as extensive metabolizers. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 749, 153-161.
- Cetinkaya, I., Ciarimboli, G., Yalcinkaya, G., Mehrens, T., Velic, A., Hirsch, J.R., Gorboulev, V., Koepsell, H., and Schlatter, E. (2003). Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *American journal of physiology Renal physiology* 284, F293-302.
- Chaulet, J.F., Grelaud, G., Bellemin-Magninot, P., Mounier, C., and Brazier, J.L. (1994). Simultaneous determination of chloroquine, proguanil and their metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 12, 111-117.
- Chiba, R., Ogasawara, A., Kubo, T., Yamazaki, H., Umino, M., and Ishizuka, Y. (2003). Direct determination of benzamides in serum by column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 19, 785-789.
- Ciarimboli, G., Koepsell, H., Iordanova, M., Gorboulev, V., Durner, B., Lang, D., Edemir, B., Schroter, R., Van Le, T., and Schlatter, E. (2005). Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16, 1562-1570.
- Ciarimboli, G., and Schlatter, E. (2005). Regulation of organic cation transport. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 449, 423-441.
- Colbourne, M.J., and Draper, C.C. (1983). Proguanil for malaria prophylaxis. *Lancet* 1, 1228.

- Curd, F.H., Davey, D.G., and Rose, F.L. (1945). Studies on synthetic antimalarial drugs; some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity. *Annals of tropical medicine and parasitology* 39, 208-216.
- Deuticke, B., Beyer, E., and Forst, B. (1982). Discrimination of three parallel pathways of lactate transport in the human erythrocyte membrane by inhibitors and kinetic properties. *Biochimica et biophysica acta* 684, 96-110.
- Dos Santos Pereira, J.N., Tadjerpisheh, S., Abu Abed, M., Saadatmand, A.R., Weksler, B., Romero, I.A., Couraud, P.O., Brockmoller, J., and Tzvetkov, M.V. (2014). The poorly membrane permeable antipsychotic drugs amisulpride and sulpiride are substrates of the organic cation transporters from the SLC22 family. *The AAPS journal* 16, 1247-1258.
- Dresser, M.J., Xiao, G., Leabman, M.K., Gray, A.T., and Giacomini, K.M. (2002). Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharmaceutical research* 19, 1244-1247.
- Edstein, M.D. (1986). Simultaneous measurement of proguanil and cycloguanil in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 380, 184-189.
- Egenberger, B., Gorboulev, V., Keller, T., Gorbunov, D., Gottlieb, N., Geiger, D., Mueller, T.D., and Koepsell, H. (2012). A substrate binding hinge domain is critical for transport-related structural changes of organic cation transporter 1. *The Journal of biological chemistry* 287, 31561-31573.
- Eichelbaum, M., Spannbrucker, N., and Dengler, H.J. (1975). Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 287 Suppl, R94.
- Ellory, J.C., Jones, S.E., and Young, J.D. (1981). Glycine transport in human erythrocytes. *The Journal of physiology* 320, 403-422.
- Estler (2006). *Pharmakologie und Toxikologie - Für studium und Praxis. 6.Auflage.*

Evans, W.E., and McLeod, H.L. (2003). Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *The New England journal of medicine* 348, 538-549.

Ferreira, A., Marguti, I., Bechmann, I., Jeney, V., Chora, A., Palha, N.R., Rebelo, S., Henri, A., Beuzard, Y., and Soares, M.P. (2011). Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* 145, 398-409.

Fleischhacker, W.W., Cetkovich-Bakmas, M., De Hert, M., Hennekens, C.H., Lambert, M., Leucht, S., Maj, M., McIntyre, R.S., Naber, D., Newcomer, J.W., *et al.* (2008). Comorbid somatic illnesses in patients with severe mental disorders: clinical, policy, and research challenges. *J Clin Psychiatry* 69, 514-519.

Giacomini, K.M., Brett, C.M., Altman, R.B., Benowitz, N.L., Dolan, M.E., Flockhart, D.A., Johnson, J.A., Hayes, D.F., Klein, T., Krauss, R.M., *et al.* (2007). The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response. *Clinical pharmacology and therapeutics* 81, 328-345.

Ginsburg, H., and Stein, W.D. (2004). The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques. *The Journal of membrane biology* 197, 113-134.

Gonzalez, F.J., Skoda, R.C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U.M., Nebert, D.W., Gelboin, H.V., Hardwick, J.P., and Meyer, U.A. (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331, 442-446.

Gorboulev, V., Ulzheimer, J.C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A.E., and Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and cell biology* 16, 871-881.

Gorboulev, V., Volk, C., Arndt, P., Akhoundova, A., and Koepsell, H. (1999). Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Molecular pharmacology* 56, 1254-1261.

- Grundemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H. (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372, 549-552.
- Hall, A.C., and Ellory, J.C. (1986). Evidence for the presence of volume-sensitive KCl transport in 'young' human red cells. *Biochimica et biophysica acta* 858, 317-320.
- HapMapConsortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.
- Helsby, N.A., Edwards, G., Breckenridge, A.M., and Ward, S.A. (1993). The multiple dose pharmacokinetics of proguanil. *Br J Clin Pharmacol* 35, 653-656.
- Hoskins, J.M., Shenfield, G.M., and Gross, A.S. (1997). Modified high-performance liquid chromatographic method to measure both dextromethorphan and proguanil for oxidative phenotyping. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 696, 81-87.
- Jaehde, R., Kloft (2010). *Klinische Pharmazie*, Vol 3.
- Jonker, J.W., and Schinkel, A.H. (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308, 2-9.
- Kekuda, R., Prasad, P.D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y.J., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *The Journal of biological chemistry* 273, 15971-15979.
- Keller, T., Egenberger, B., Gorboulev, V., Bernhard, F., Uzelac, Z., Gorbunov, D., Wirth, C., Koppatz, S., Dotsch, V., Hunte, C., *et al.* (2011). The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 286, 37874-37886.
- Kerb, R., Brinkmann, U., Chatskaia, N., Gorbunov, D., Gorboulev, V., Mornhinweg, E., Keil, A., Eichelbaum, M., and Koepsell, H. (2002). Identification of genetic variations

of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 12, 591-595.

Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T., and Inui, K. (2005). Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 20, 379-386.

Kirk, K., Poli de Figueiredo, C.E., Elford, B.C., and Ellory, J.C. (1992). Effect of cell age on erythrocyte choline transport: implications for the increased choline permeability of malaria-infected erythrocytes. *The Biochemical journal* 283 (Pt 2), 617-619.

Koehler, M.R., Wissinger, B., Gorboulev, V., Koepsell, H., and Schmid, M. (1997). The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenetics and cell genetics* 79, 198-200.

Koepsell, H. (2004). Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 25, 375-381.

Koepsell, H. (2011). Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem* 392, 95-101.

Koepsell, H., Gorboulev, V., and Arndt, P. (1999). Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *The Journal of membrane biology* 167, 103-117.

Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical research* 24, 1227-1251.

Koepsell, H., Schmitt, B.M., and Gorboulev, V. (2003). Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150, 36-90.

Kotan, Z., Ertepe, B., Akkaya, C., Sarandol, E., Ozkaya, G., and Kirli, S. (2011). Metabolic, endocrinologic and cardiac effects of amisulpride: a 24-week follow-up study. *Therapeutic advances in psychopharmacology* 1, 189-196.

Kromidas (2011). *Validierung in der Analytik*, Vol 2 (Wiley-VCH).

- Kudris, I.V., Skakun, N.N., Orlova, I.N., Libina, V.V., and Kulikov, A.U. (2011). Analysis of Amisulpride in Human Plasma by SPE and LC with Fluorescence Detection. *Chromatographia* 73, 67-74.
- Kusaka, M., Setiabudy, R., Chiba, K., and Ishizaki, T. (1996). Simultaneous measurement of proguanil and its metabolites in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography, and its preliminary application in relation to genetically determined S-mephenytoin 4'-hydroxylation status. *Am J Trop Med Hyg* 54, 189-196.
- Langner (2011). *Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart).
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., and Davis, J.M. (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373, 31-41.
- Leucht, S., Pitschel-Walz, G., Engel, R.R., and Kissling, W. (2002). Amisulpride, an unusual "atypical" antipsychotic: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiatry* 159, 180-190.
- Lindsay, S. (2000). *Einführung in die HPLC, Vol 1*.
- Lohöfer (2013). Grubbs- Test. In *Mathematik für Biologen*.
- Lynch, T., and Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American family physician* 76, 391-396.
- Maegraith, B.G., Adams, A.R., and et al. (1945). Studies on synthetic antimalarial drugs; results of a preliminary investigation of the therapeutic action of 4888 (paludrine) on acute attacks of malignant tertian malaria. *Annals of tropical medicine and parasitology* 39, 232-236.
- Mahgoub, A., Idle, J.R., Dring, L.G., Lancaster, R., and Smith, R.L. (1977). Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2, 584-586.

- Malcolm, S.L., and Marten, T.R. (1976). Determination of debrisoquin and its 4-hydroxy metabolite in plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 48, 807-809.
- Medina, M.A., Giachetti, A., and Shore, P.A. (1969). On the physiological disposition and possible mechanism of the antihypertensive action of debrisoquin. *Biochem Pharmacol* 18, 891-901.
- Meyer, V.R. (2009). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Vol 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.
- Milne, M.D., Scribner, B.H., and Crawford, M.A. (1958). Non-ionic diffusion and the excretion of weak acids and bases. *The American journal of medicine* 24, 709-729.
- Moaddel, R., Patel, S., Jozwiak, K., Yamaguchi, R., Ho, P.C., and Wainer, I.W. (2005). Enantioselective binding to the human organic cation transporter-1 (hOCT1) determined using an immobilized hOCT1 liquid chromatographic stationary phase. *Chirality* 17, 501-506.
- Mogili, R., Kanala, K., Challa, B.R., Chandu, B.R., and Bannoth, C.K. (2011). Development and validation of amisulpride in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Scientia pharmaceutica* 79, 583-599.
- Moller, H.J. (2000). Amisulpride: a review of its efficacy in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 400, 17-22.
- Mons, B. (1990). Preferential invasion of malarial merozoites into young red blood cells. *Blood cells* 16, 299-312.
- Mortimer, A.M. (2003). Antipsychotic treatment in schizophrenia: atypical options and NICE guidance. *Eur Psychiatry* 18, 209-219.
- Mutschler, E. (2013). *Arzneimittelwirkungen*, Vol 10 (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart).

- Neuhoff, S., Ungell, A.L., Zamora, I., and Artursson, P. (2003). pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm Res* 20, 1141-1148.
- Newcomer, J.W. (2005). Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs* 19 Suppl 1, 1-93.
- Nies, A.T., Herrmann, E., Brom, M., and Keppler, D. (2008). Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 376, 449-461.
- Nies, A.T., Koepsell, H., Damme, K., and Schwab, M. (2011). Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*, 105-167.
- Nies, A.T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., Zanger, U.M., Keppler, D., Schwab, M., and Schaeffeler, E. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50, 1227-1240.
- Nishihara, K., Kohda, Y., and Tamura, Z. (1983). Determination of sultopride in serum and saliva by high-performance liquid chromatography. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 31, 4144-4146.
- Nishimura, M., and Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 20, 452-477.
- Okuda, M., Saito, H., Urakami, Y., Takano, M., and Inui, K. (1996). cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochemical and biophysical research communications* 224, 500-507.
- Palm, K., Luthman, K., Ros, J., Grasjo, J., and Artursson, P. (1999). Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291, 435-443.

- Pereira, V.A., Auler, J.O., Jr., Carmona, M.J., Mateus, F.H., Lanchote, V.L., Breimer, D.D., and Santos, S.R. (2000). A micromethod for quantitation of debrisoquine and 4-hydroxydebrisoquine in urine by liquid chromatography. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al] 33, 509-514.
- Rücker, N., Willems (2001). *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Vol 1.
- Russell, J.M., and Mackell, J.A. (2001). Bodyweight gain associated with atypical antipsychotics: epidemiology and therapeutic implications. *CNS Drugs* 15, 537-551.
- Saadatmand, A.R., Tadjerpisheh, S., Brockmoller, J., and Tzvetkov, M.V. (2012). The prototypic pharmacogenetic drug debrisoquine is a substrate of the genetically polymorphic organic cation transporter OCT1. *Biochemical pharmacology* 83, 1427-1434.
- Sachse-Seeboth, C., Pfeil, J., Sehrt, D., Meineke, I., Tzvetkov, M., Bruns, E., Poser, W., Vormfelde, S.V., and Brockmoller, J. (2009). Interindividual variation in the pharmacokinetics of Delta9-tetrahydrocannabinol as related to genetic polymorphisms in CYP2C9. *Clinical pharmacology and therapeutics* 85, 273-276.
- Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Nagata, H., Tsukimori, K., *et al.* (2005). Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 888-895.
- Schmitt, B.M., and Koepsell, H. (2005). Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *The Journal of biological chemistry* 280, 24481-24490.
- Schoemaker, H., Claustre, Y., Fage, D., Rouquier, L., Chergui, K., Curet, O., Oblin, A., Gonon, F., Carter, C., Benavides, J., *et al.* (1997). Neurochemical characteristics of amisulpride, an atypical dopamine D2/D3 receptor antagonist with both presynaptic and limbic selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 83-97.

- Seitz, T., Stalmann, R., Dalila, N., Chen, J., Pojar, S., Dos Santos Pereira, J.N., Kratzner, R., Brockmoller, J., and Tzvetkov, M.V. (2015). Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1. *Genome medicine* 7, 56.
- Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, N.G., Hadden, J.M., Sharples, D., Sansom, M.S., Iwata, S., Henderson, P.J., and Cameron, A.D. (2010). Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science* 328, 470-473.
- Shu, Y., Leabman, M.K., Feng, B., Mangravite, L.M., Huang, C.C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S.J., DeYoung, J., Carlson, E., *et al.* (2003). Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5902-5907.
- Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., Ianculescu, A.G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., *et al.* (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *The Journal of clinical investigation* 117, 1422-1431.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *The Journal of biological chemistry* 273, 20378-20382.
- Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS letters* 419, 107-111.
- Thews, M., Vaupel (1999). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Vol 5.

Tschoner, A., Engl, J., Laimer, M., Kaser, S., Rettenbacher, M., Fleischhacker, W.W., Patsch, J.R., and Ebenbichler, C.F. (2007). Metabolic side effects of antipsychotic medication. *Int J Clin Pract* 61, 1356-1370.

Tzvetkov, M.V., dos Santos Pereira, J.N., Meineke, I., Saadatmand, A.R., Stingl, J.C., and Brockmoller, J. (2013). Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochemical pharmacology* 86, 666-678.

Tzvetkov, M.V., Saadatmand, A.R., Bokelmann, K., Meineke, I., Kaiser, R., and Brockmoller, J. (2012). Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J* 12, 22-29.

Tzvetkov, M.V., Saadatmand, A.R., Lotsch, J., Tegeder, I., Stingl, J.C., and Brockmoller, J. (2011). Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 90, 143-150.

Tzvetkov, M.V., Vormfelde, S.V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehr, D., Sabolic, I., Koepsell, H., and Brockmoller, J. (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clinical pharmacology and therapeutics* 86, 299-306.

Wu, X., Kekuda, R., Huang, W., Fei, Y.J., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., and Ganapathy, V. (1998a). Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *The Journal of biological chemistry* 273, 32776-32786.

Wu, X., Prasad, P.D., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998b). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochemical and biophysical research communications* 246, 589-595.

Xiberras, X., Martinot, J.L., Mallet, L., Artiges, E., Canal, M., Loc'h, C., Maziere, B., and Paillere-Martinot, M.L. (2001). In vivo extrastriatal and striatal D2 dopamine receptor blockade by amisulpride in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 21, 207-214.

Zhang, L., Dresser, M.J., Gray, A.T., Yost, S.C., Terashita, S., and Giacomini, K.M. (1997). Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Molecular pharmacology* 51, 913-921.

7. Anhang

Schnelltest nach David auf Normalverteilung

Tabelle für den Schnelltest nach David auf Normalverteilung:

n	untere Schranke G_u mit Sicherheit				obere Schranke G_o mit Sicherheit			
	99,9%	99%	95%	90%	90%	95%	99%	99,9%
3	1,732	1,737	1,758	1,782	1,997	1,999	2,000	2,000
4	1,732	1,87	1,98	2,04	2,409	2,429	2,445	2,449
5	1,826	2,02	2,15	2,22	2,712	2,753	2,803	2,828
6	1,826	2,15	2,28	2,37	2,949	3,012	3,095	3,162
7	1,871	2,26	2,40	2,49	3,143	3,222	3,338	3,464
8	1,871	2,35	2,50	2,59	3,308	3,399	3,543	3,742
9	1,897	2,44	2,59	2,68	3,449	3,552	3,720	4,000
10	1,897	2,51	2,67	2,76	3,57	3,685	3,875	4,243
11	1,915	2,58	2,47	2,48	3,68	3,80	4,012	4,472
12	1,915	2,64	2,80	2,90	3,78	3,91	4,134	4,690
13	1,927	2,70	2,86	2,96	3,87	4,00	4,244	4,899
14	1,972	2,75	2,92	3,02	3,95	4,09	4,34	5,099
15	1,936	2,80	2,97	3,07	4,02	4,17	4,44	5,292
16	1,936	2,84	3,01	3,12	4,09	4,24	4,52	5,477
17	1,944	2,88	3,06	3,17	4,15	4,31	4,60	5,657
18	1,944	2,92	3,10	3,21	4,21	4,37	4,67	5,831
19	1,949	2,96	3,14	3,25	4,27	4,43	4,74	6,000
20	1,949	2,99	3,18	3,29	4,32	4,49	4,80	6,164
25	1,961	3,15	3,34	3,45	4,53	4,71	5,06	6,93
30	1,966	3,27	3,47	3,59	4,70	4,89	5,26	7,62
35	1,972	3,38	3,58	3,70	4,84	5,04	5,42	8,25
40	1,975	3,47	3,67	3,79	4,96	5,16	5,56	8,83
45	1,978	3,55	3,75	3,88	5,06	5,26	5,67	9,38
50	1,980	3,62	3,83	3,95	5,14	5,35	5,77	9,90
60	1,983	3,75	3,96	4,08	5,29	5,51	5,94	10,86
70	1,986	3,85	4,06	4,19	5,41	5,63	6,07	11,75
80	1,987	3,94	4,16	4,28	5,51	5,73	6,18	12,57
90	1,989	4,02	4,24	4,36	5,60	5,82	6,27	13,34
100	1,990	4,10	4,31	4,44	5,68	5,90	6,36	14,07
150	1,993	4,38	4,59	4,72	5,96	6,18	6,64	17,26
200	1,995	4,59	4,78	4,90	6,15	6,39	6,84	19,95
500	1,998	5,13	5,37	5,49	6,72	6,94	7,42	31,59
1000	1,999	5,57	5,79	5,92	7,11	7,33	7,80	44,70
	99,9%	99%	95%	90%	90%	95%	99%	99,9%
	untere Schranke G_u mit Sicherheit				obere Schranke G_o mit Sicherheit			

Abbildung 7-1: Test nach David.

Modifiziert nach (Lohöfer, 2013)

Tabelle $r_m(P)$ -Werte zum Ausreißertest nach Grubbs

f	P(90%)	P(95%)	P(99%)
3	1,148	1,153	1,155
4	1,425	1,463	1,492
5	1,602	1,672	1,749
6	1,729	1,822	1,944
7	1,828	1,938	2,097
8	1,909	2,032	2,221
9	1,977	2,110	2,323
10	2,036	2,176	2,410
11	2,088	2,234	2,485
12	2,134	2,285	2,550
13	2,175	2,331	2,607
14	2,213	2,371	2,659
15	2,247	2,409	2,705
16	2,279	2,443	2,747
17	2,309	2,475	2,785
18	2,335	2,504	2,821
19	2,361	2,532	2,854
20	2,385	2,557	2,884
21	2,408	2,580	2,912
22	2,429	2,603	2,939
23	2,448	2,624	2,963
24	2,467	2,644	2,987
25	2,486	2,663	3,009
26	2,502	2,681	3,029
27	2,519	2,698	3,049
28	2,534	2,714	3,068
29	2,549	2,730	3,085
30	2,563	2,745	3,103
31	2,577	2,759	3,119
32	2,591	2,773	3,135
33	2,604	2,786	3,150
34	2,616	2,799	3,164
35	2,628	2,811	3,178
36	2,639	2,823	3,191
37	2,650	2,835	3,204
38	2,661	2,846	3,216
39	2,671	2,857	3,228
40	2,682	2,866	3,240

Abbildung 7-2: Schnelltest nach Grubbs.

modifiziert nach (Kromidas, 2011)

df/p	0,01	0,005	0,0005
1	31,82052	63,65674	636,6192
2	6,96456	9,92484	31,5991
3	4,54070	5,84091	12,9240
4	3,74695	4,60409	8,6103
5	3,36493	4,03214	6,8688
6	3,14267	3,70743	5,9588
7	2,99795	3,49948	5,4079
8	2,89646	3,35539	5,0413
9	2,82144	3,24984	4,7809
10	2,76377	3,16927	4,5869
11	2,71808	3,10581	4,4370
12	2,68100	3,05454	4,3178
13	2,65031	3,01228	4,2208
14	2,62449	2,97684	4,1405
15	2,60248	2,94671	4,0728
16	2,58349	2,92078	4,0150
17	2,56693	2,89823	3,9651
18	2,55238	2,87844	3,9216
19	2,53948	2,86093	3,8834
20	2,52798	2,84534	3,8495
21	2,51765	2,83136	3,8193
22	2,50832	2,81876	3,7921
23	2,49987	2,80734	3,7676
24	2,49216	2,79694	3,7454
25	2,48511	2,78744	3,7251
26	2,47863	2,77871	3,7066
27	2,47266	2,77068	3,6896
28	2,46714	2,76326	3,6739
29	2,46202	2,75639	3,6594
30	2,45726	2,75000	3,6460
∞	2,32635	2,57583	3,2905

Abbildung 7-3: Tabelle- t-Test,

modifiziert nach wiley-vch.e-bookshelf.de

8. Publikationen

1. **The prototypic pharmacogenetic drug debrisoquine is a substrate of the genetically polymorphic organic cation transporter OCT1.**

Saadatmand AR, **Tadjerpisheh S**, Brockmöller J, Tzvetkov MV. *Biochem Pharmacol.* 2012 May 15;83(10):1427-34.

2. **The poorly membrane permeable antipsychotic drugs amisulpride and sulpiride are substrates of the organic cation transporters from the SLC22 family.**

Dos Santos Pereira JN, **Tadjerpisheh S**, Abu Abed M, Saadatmand AR, Weksler B, Romero IA, Couraud PO, Brockmöller J, Tzvetkov MV. *AAPS J.* 2014 Nov;16(6):1247-58